



**Les interactions entre la photorespiration et le  
métabolisme primaire des feuilles d'*Arabidopsis  
thaliana* : Caractérisation de mutants pour les enzymes  
photorespiratoires "glycolate oxydase" et  
"glutamate:glyoxylate aminotransférase 1"**

Younes Delloero

► **To cite this version:**

Younes Delloero. Les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire des feuilles d'*Arabidopsis thaliana* : Caractérisation de mutants pour les enzymes photorespiratoires "glycolate oxydase" et "glutamate:glyoxylate aminotransférase 1". Amélioration des plantes. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS195 . tel-01259298

**HAL Id: tel-01259298**

**<https://theses.hal.science/tel-01259298>**

Submitted on 25 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT**  
**DE**  
**L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY**  
**PREPAREE A**  
**“ L'INSTITUT DES SCIENCES DES PLANTES DE PARIS-SACLAY (IPS2)”**

ECOLE DOCTORALE N° 145  
Sciences du végétal : du gène à l'écosystème

Spécialité de doctorat : Biologie

Par

**Mr Younès DELLERO**

**L'interaction de la photorespiration avec le métabolisme primaire des  
feuilles d'*Arabidopsis thaliana* : Caractérisation de mutants pour la  
glycolate oxydase et la glutamate:glyoxylate aminotransférase 1**

**Thèse présentée et soutenue à l'Institut des Sciences des Plantes de Paris-Saclay (IPS2),  
le 14 Décembre 2015 :**

**Composition du Jury :**

Mme Jaleh Ghashghaie	Professeur à l'Université Paris-Saclay	Présidente
Mr Jean-Christophe Avice	Professeur à l'Université de Caen	Rapporteur
Mr Dominique Rolin	Professeur à l'Université de Bordeaux	Rapporteur
Mr Stefan Timm	Assistant Professeur à l'Université de Rostock	Examineur
Mr Michael Hodges	Directeur de recherche à l'Université Paris-Saclay	Directeur de thèse

## Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury Jean-Christophe Avice, Dominique Rolin, Jaleh Ghashghaie et Stefan Timm pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse.

Je remercie Céline Masclaux-Daubresse et Gabriel Cornic, pour avoir accepté d'être les membres invités de mes deux comités de thèse.

Je tiens sincèrement à remercier mon directeur de thèse, Michaël Hodges, pour m'avoir fait partager sa passion pour la recherche. Merci d'avoir été présent pour moi pendant ces 4 années (y compris les jours fériés et les vacances). Merci aussi d'avoir soutenu certains de mes choix scientifiques. Je ne pense pas qu'il aurait pu y avoir un meilleur encadrant que toi. Tu es une personne exceptionnelle sur le plan scientifique, mais aussi sur le plan humain. Merci de m'avoir transmis tes connaissances, et surtout ta manière de raisonner scientifiquement. Nos discussions pendant le café du matin vont beaucoup me manquer, de même que ton humour anglais.

Je tiens également à remercier Mathieu Jossier, pour ces 4 années passées à mes côtés. Merci de m'avoir encadré à la paillasse durant mes premiers pas. Merci aussi pour tes précieux conseils qui ont pu me servir au cours de ma thèse. Bien évidemment, merci pour la construction de la lignée *amiRgox1/2* (par contre pour l'arrosage...☺). Tu es aussi une personne exceptionnelle, et tout comme Michaël, nos discussions pendant le café du matin vont beaucoup me manquer, de même que ton humour.

Je remercie Guillaume Tcherkez pour m'avoir initié à l'utilisation des isotopes stables en biologie. Merci de m'avoir accordé du temps pour discuter d'échanges gazeux, de marquages, et surtout de mécanisme réactionnel enzymatique. Merci également de m'avoir aidé pour l'analyse des spectres  $^{13}\text{C}$  de la RMN. Ces moments ont été très précieux et utiles pour l'accomplissement de cette thèse.

Je tiens à remercier également Nathalie Glab et Céline Oury pour les discussions que nous avons pu avoir autour d'un café le matin, mais aussi autour de certaines de mes PCRs qui ne marchaient pas ☺... Bien évidemment, merci pour la construction de la lignée *compl*, qui m'a été très précieuse pour la fin de cette thèse. Merci aussi pour les gâteaux, miam !

Je remercie Caroline Mauve, ma « cacao-pote » pour les discussions drôles et intéressantes que nous avons eues à propos de la vie, mais aussi à propos de l'isotopie (iiii). Merci aussi pour m'avoir aidé pour l'utilisation de la LC-co-IRMS. Et pour les gâteaux aussi, miam !

Je remercie Edouard Boex-Fontveille pour m'avoir aidé pour les premiers clonages de la GOX dans le pET28a, mais aussi pour la fameuse chambre ! Merci aussi pour tes « chaleureux » encouragements.

Je remercie Cyril Abadie pour les discussions intéressantes que nous avons eues autour d'un LiCOR : je pense notamment au VPD !

Merci aux « Platform Girls » Françoise Gilard, Florence Guérard, Marlène Lamothe-Sibold et Valérie Cantonny pour votre gentillesse et votre disponibilité. Merci de m'avoir appris vos différentes techniques de chromatographies, et aussi de m'avoir laissé utiliser certains appareils en autonomie.

Merci à Linda De-Bont pour m'avoir enseigné l'art du dosage des cofacteurs en microplaques, mais aussi pour l'aide dans la mise au point du dosage de l'amidon. Merci aussi pour les gâteaux, miam !

Merci à mes deux « Topotes du jedi » Manon Richard et Chouaib Meziadi pour ces supers jeudi après-midi passés à animer les séminaires à coup de « jingles » annonces. C'était vraiment sympa de s'être lancé ensemble dans cette aventure.

Merci à Mathilde Fagard et Alban Launay pour être venu rechercher mon expertise sur la mesure de l'activité GOX, et m'avoir fait confiance dans la réalisation de cette tâche sur leurs échantillons de plantes.

Je remercie aussi les différents stagiaires de l'équipe et de l'institut: Florian, Julien, Parisa, Atem, Nathaniel, Pauline, Manon, Anaëlle, Clémentine, Rémi, Charley, Briec et Quentin pour les bons moments passés dans la matrice et/ou autour de cette fameuse table ! D'ailleurs, je remercie chaleureusement tous ceux qui ont partagé un moment avec moi autour de cette table !

Je tiens à remercier les services techniques de l'institut, notamment Jean-Paul Bares et Eric Lambert pour le temps, l'aide ainsi que l'expertise qu'ils m'ont accordé afin de réaliser différents systèmes d'échanges gazeux.

Merci également aux services communs de l'institut qui nous permettent de réaliser les expériences dans de bonnes conditions : la laverie, les espaces de cultures et l'administration.

Merci aussi aux autres personnes de l'institut avec qui j'ai passé des moments agréables : Bertrand G, Yanpei L, Jingfang H, Ting-Ting L, Yuan S, Zheng Z, José G, Quentin B, Thomas G, Laure A, Jean-Claude P, Marie-Sylviane R.

Je tiens à remercier ma famille, qui m'a donné les moyens de poursuivre mes études jusqu'à cette thèse, mais aussi qui m'a soutenu tout au long de mon parcours universitaire.

Pour finir, je te remercie Malika de faire partie de ma vie. Merci de m'avoir soutenu au cours de cette thèse, de m'avoir supporté dans les mauvais comme les bons moments. Tu as été mon phare dans la nuit noire. C'est maintenant une nouvelle page pleine de promesses qui se tourne pour nous !



## Liste des Abréviations

<b>2-OG</b>	2-oxoglutarate
<b>2-PG</b>	2-phosphoglycolate
<b>3-PGA</b>	3-phosphoglycérate
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>ADN-T</b>	ADN de transfert
<b>AOAT</b>	Alanine:2-oxoglutarate aminotransférase
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Chl</b>	Chlorophylle
<b>COE</b>	Complexe d'oxydation de l'eau
<b>dATP</b>	Désoxyriboadénosine triphosphate
<b>dCTP</b>	Désoxyribocytosine triphosphate
<b>dGTP</b>	Désoxyriboguanine triphosphate
<b>DiT</b>	Transporteur de dicarboxylates
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>dTTP</b>	Désoxyribothymine triphosphate
<b>E4P</b>	Erythrose-4-phosphate
<b>EDTA</b>	Acide éthylène diamine tetraacétique
<b>EGTA</b>	Acide éthylène glycol tetraacétique
<b>ETR</b>	Taux de transfert d'électrons
<b>F1,6bP</b>	Fructose-1,6-bisphosphate
<b>F6P</b>	Fructose-6-phosphate
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucléotide
<b>Fd</b>	Ferredoxine
<b>FMN</b>	Flavine mononucléotide
<b>FNR</b>	Ferredoxine réductase à NADP
<b>FTR</b>	Ferredoxine thiorédoxine réductase
<b>G3P</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate
<b>GC-MS</b>	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
<b>GDC</b>	Glycine décarboxylase
<b>GDH</b>	Protéine H de la GDC
<b>GDP</b>	Protéine P de la GDC
<b>GDT</b>	Protéine T de la GDC
<b>GFP</b>	Protéine fluorescente verte
<b>GGT</b>	Glutamate:glyoxylate aminotransférase

<b>GLYK</b>	Glycérate kinase
<b>GOGAT</b>	Glutamine:2-oxoglutarate aminotransférase
<b>GOX</b>	Glycolate oxydase
<b>GS</b>	Glutamate synthétase
<b>HAOX</b>	Hydroxyacide oxydase
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide à haute performance
<b>HPR</b>	Hydroxypyruvate réductase
<b>HR</b>	Réaction hypersensible
<b>HRP</b>	Peroxydase de raifort
<b>IRMS</b>	Spectromètre de masse à ratio isotopique
<b>KIE</b>	Effet isotopique cinétique
<b>LC-c-IRMS</b>	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à ratio isotopique
<b>LHCI et II</b>	Antennes collectrices de lumière des PSI et PSII
<b>LPD</b>	Protéine L de la GDC
<b>NADH</b>	Nicotinamide adénosine dinucléotide
<b>NAD-ME</b>	Enzyme malique à NAD
<b>NADPH</b>	Nicotinamide adénosine dinucléotidephosphate
<b>NADP-ME</b>	Enzyme malique à NADP
<b>NiR</b>	Nitrite réductase
<b>NO</b>	Oxyde nitrique
<b>NPQ</b>	Quenching non-photochimique
<b>NR</b>	Nitrate réductase
<b>ORF</b>	Phase ouverte de lecture
<b>P680</b>	Donneur primaire du PSII
<b>P700</b>	Donneur primaire du PSI
<b>PC</b>	Plastocyanine
<b>PCR</b>	Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PDH</b>	Pyruvate déshydrogénase
<b>PDK</b>	Pyruvate déshydrogénase kinase
<b>PEP</b>	Phosphoenolpyruvate
<b>PEPc</b>	Phosphoenolpyruvate carboxylase
<b>PGLP</b>	Phosphoglycolate phosphatase
<b>PDH</b>	Pyruvate kinase
<b>Phéo</b>	Phéophytine
<b>PIB</b>	Burst de CO <sub>2</sub> post-illuminatoire
<b>PDK</b>	Pyruvate kinase
<b>PLGG</b>	Transporteur plastidial de glycolate/glycérate
<b>PQ</b>	Plastoquinone
<b>PRK</b>	Phosphoribulokinase
<b>PSI et II</b>	Photosystèmes I et II
<b>PVP</b>	Polyvinylpyridine
<b>Q<sub>A</sub></b>	Quinone A
<b>R5P</b>	Ribose-5-phosphate
<b>RBCL</b>	Grande sous-unité de la RuBisCO

<b>RBCS</b>	Petite sous-unité de la RuBisCO
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>Ru5P</b>	Ribulose-5-phosphate
<b>RuBisCO</b>	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
<b>S1,7bP</b>	Sédoheptulose-1,7-bisphosphate
<b>S7P</b>	Sédoheptulose-7-phosphate
<b>SDS</b>	Dodécyl sulfate de sodium
<b>SDS-PAGE</b>	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du SDS
<b>SGAT</b>	Sérine:glyoxylate aminotransférase
<b>SHMT</b>	Sérine:hydroxyméthyl amino transférase
<b>TE</b>	Tampon Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	Tétraméthyléthylènediamine
<b>THF</b>	Tétrahydrofolate
<b>TOF</b>	Temps de vol
<b>UTR</b>	Région non traduite de l'ARNm
<b>VPD</b>	Déficit de pression de vapeur
<b>X5P</b>	Xylulose-5-phosphate

# Sommaire

Introduction.....	1
I. La photosynthèse.....	1
1) La phase photochimique .....	1
2) La phase « sombre » .....	4
3) La photosynthèse chez les plantes en C <sub>4</sub> .....	6
II. La photorespiration .....	7
1) Description générale .....	7
2) Les enzymes et transporteurs du cycle photorespiratoire chez <i>A. thaliana</i> ...	9
a) Enzymes clés associées au recyclage du 2-PG en 3-PGA.....	10
b) Les transporteurs de métabolites photorespiratoires.....	14
c) Enzymes impliquées dans le recyclage des produits de la photorespiration.....	16
3) Diversité des phénotypes des mutants photorespiratoires .....	19
4) Intérêts agronomiques liés à la photorespiration .....	21
III. Les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire dans les feuilles de plantes.....	25
1) Interactions avec la photosynthèse .....	26
2) Interactions avec le Cycle de Krebs .....	28
3) Interactions avec l'assimilation d'azote .....	31
4) Interactions avec le métabolisme C <sub>1</sub> .....	33
5) Les voies de biosynthèse de la sérine chez les plantes .....	35
IV. La régulation concertée des enzymes de la photorespiration .....	37
1) Transcriptionnelle .....	37
a) La lumière.....	37
b) Le ratio glycine/sérine dans les feuilles.....	37
2) Post-traductionnelle .....	38
a) La nitrosylation.....	38
b) La phosphorylation protéique.....	39
V. La glycolate oxidase .....	39
1) La GOX chez <i>A. thaliana</i> .....	39
2) Le mécanisme réactionnel de la GOX .....	41
3) Les mutants de la GOX déjà caractérisés dans la littérature .....	43
4) Rôle de la GOX dans la réponse aux attaques pathogènes .....	45
VI. La glutamate:glyoxylate aminotransférase .....	48
VII. Objectifs des travaux de thèse .....	51
Résultats.....	54
Résumé de l'article I.....	54
<u>Article I</u> : Le mécanisme réactionnel des GOX de plantes opère selon un transfert d'hydrure.....	56

Résumé des articles II et III.....	62
<u>Article II</u> : Les mutants photorespiratoires <i>glutamate:glyoxylate aminotransférase 1</i> d' <i>A. thaliana</i> maintiennent une balance carbone/azote constante en réduisant leur quantité de RuBisCO et leur croissance.....	66
<u>Article III</u> : Un mutant photorespiratoire glycolate oxydase chez <i>Arabidopsis thaliana</i> montre une altération de son allocation de carbone et de la sénescence dans ses feuilles après un transfert de fort CO <sub>2</sub> dans l'air.....	77
Discussion générale.....	109
I. Rappel du contexte scientifique.....	109
II. L'inhibition de l'activité photosynthétique chez les mutants photorespiratoires dans l'air est principalement due au ralentissement du recyclage du carbone pour la régénération du RuBP par le cycle de Calvin-Benson.....	110
III. L'inhibition de la photorespiration chez les mutants photorespiratoires dans l'air diminue la quantité de RuBisCO foliaire à cause de l'inhibition de la photosynthèse.....	116
IV. La forte inhibition de la photosynthèse chez les mutants photorespiratoires déclenche la mise en place de la sénescence.....	118
Perspectives générales.....	124
I. L'identification des transporteurs de métabolites photorespiratoires .....	124
II. La régulation des enzymes photorespiratoires par phosphorylation .....	125
III. Le rôle de la photorespiration dans la réponse aux attaques de pathogènes.....	127
IV. La surexpression de gènes codant les enzymes GDC et SHMT chez des plantes d'intérêt agronomique .....	129
Matériel et méthodes.....	131
I. Matériel.....	131
1) Souches bactériennes .....	131
a) Souches d' <i>Escherichia Coli</i> .....	131
b) Souches d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	131
2) Plasmides .....	131
a) Plasmides utilisés pour les clonages.....	131
b) Plasmides utilisés pour l'expression de protéines recombinantes.....	132
c) Plasmides utilisés pour la transformation d' <i>A. thaliana</i> par <i>A. tumefaciens</i> .....	133
3) Matériel végétal.....	134
a) Lignée de contrôle.....	134
b) Lignées d'insertion ADN-T.....	134
4) Amorces d'ADN.....	135
a) Amorces d'ADN pour le génotypage des mutants d'insertion.....	135
b) Amorces d'ADN pour les clonages.....	136
c) Amorces d'ADN pour la qPCR.....	137

<b>II.</b>	<b>Méthodes.....</b>	<b>137</b>
<b>1)</b>	<b>Cultures des plantes.....</b>	<b>137</b>
a)	<b>Stérilisation des graines.....</b>	<b>137</b>
b)	<b>Culture <i>in vitro</i>.....</b>	<b>137</b>
c)	<b>Culture en terre.....</b>	<b>137</b>
<b>2)</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>138</b>
a)	<b>Techniques courantes.....</b>	<b>138</b>
	<i>i) Dosage des acides nucléiques</i>	
	<i>ii) Réaction de polymérisation en chaîne</i>	
	<i>iii) Migration des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose</i>	
b)	<b>Techniques relatives à l'ADN.....</b>	<b>138</b>
	<i>i) Extraction d'ADN génomique « propre »</i>	
	<i>ii) Extraction d'ADN génomique « rapide et sale »</i>	
	<i>iii) Génotypage des lignées d'insertion ADN-T (simples mutants)</i>	
c)	<b>Techniques relatives aux ARNm.....</b>	<b>140</b>
	<i>i) Extraction des ARN totaux</i>	
	<i>ii) Traitement des ARN totaux avec une endonucléase</i>	
	<i>iii) Transcription inverse des ARN messagers (ARNm)</i>	
	<i>iv) Quantification des ARNm par qPCR</i>	
d)	<b>Techniques relatives aux clonages.....</b>	<b>142</b>
	<i>i) Culture des bactéries</i>	
	<i>ii) Extraction d'ADN plasmidique</i>	
	<i>iii) Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique</i>	
	<i>iv) Purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose</i>	
	<i>v) Ligation d'un fragment d'ADN dans un plasmide</i>	
	<i>vi) Transformation de bactéries électrocompétentes et sélection des transformants</i>	
	<i>vii) Clonage des ADNc codants AtGOX1 ou ZmGO1 dans pET28a</i>	
	<i>viii) Clonage du gène amiRGOX1/2 dans le plasmide pAlligator2 par le système Gateway®</i>	
	<i>ix) Clonage du promoteur du gène SHMT1 d'A. thaliana dans le plasmide pK7GW</i>	
	<i>x) Clonage de l'ADNc codant ZmGO1 dans le plasmide pK7GW-proSHMT1 par le système Gateway®</i>	
e)	<b>Techniques de transformation d'A. thaliana par A. tumefaciens et de sélection de lignées homozygotes.....</b>	<b>146</b>
	<i>i) Transformation d'A. thaliana par « floral dip »</i>	
	<i>ii) Sélection des plantes amiRgox1/2 et compl homozygotes avec une insertion</i>	
<b>3)</b>	<b>Techniques de biochimie des protéines .....</b>	<b>147</b>
a)	<b>Production et purification de protéines recombinantes avec une étiquette histidine .....</b>	<b>147</b>
b)	<b>Séparation de protéines sur gel SDS-PAGE.....</b>	<b>148</b>
c)	<b>Western-Blot .....</b>	<b>149</b>
d)	<b>Mesures d'activités enzymatiques.....</b>	<b>149</b>
	<i>i) Mesure de l'activité des GOX recombinantes</i>	
	<i>ii) Calcul des paramètres cinétiques des GOX recombinantes</i>	
	<i>iii) Calcul des effets isotopiques H/D des protéines recombinantes</i>	

iv) Activité de la GOX de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	
v) Activité de la GGT de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	
vi) Activité carboxylase de la RuBisCO de feuilles d' <i>A. thaliana</i>	
e) Quantification des protéines solubles.....	153
4) Analyse des échanges gazeux et des paramètres de fluorescence chlorophyllienne.....	154
a) Mesure des échanges gazeux de CO <sub>2</sub> et d'H <sub>2</sub> O.....	154
b) Mesure des paramètres de fluorescence chlorophyllienne.....	156
c) Conditions de marquages des plantes <i>A. thaliana</i> au <sup>13</sup> CO <sub>2</sub> .....	157
5) Analyse de métabolites.....	158
a) Dosages de nitrates et d'ammonium.....	158
b) Dosage des chlorophylles.....	159
c) Dosage du glucose et de l'amidon.....	159
d) Dosage de NAD <sup>+</sup> /NADH et NADP <sup>+</sup> /NADPH.....	160
e) Dosage d'ATP et d'ADP.....	160
f) Quantification relative du carbone et de l'azote totaux de feuilles de rosettes.....	161
g) Analyses métabolomiques.....	162
i) Extraction des métabolites primaires polaires	
ii) Analyse relative des métabolites par GC-MS	
iii) Analyse quantitative des acides aminés par HPLC	
h) Analyse quantitative du <sup>13</sup> C en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	164
i) Extraction des métabolites et préparation des échantillons pour la RMN	
ii) Principe de la RMN	
iii) Analyses par RMN	
i) Analyse de la discrimination isotopique en <sup>13</sup> C des GOX en abondance naturelle.....	167
i) Discrimination isotopique d'une enzyme pour le <sup>13</sup> C et l'effet isotopique associé	
ii) Analyse de la signature isotopique <sup>13</sup> C (δ <sup>13</sup> C) du glycolate	
<b>Bibliographie.....</b>	<b>171</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>189</b>

# Introduction



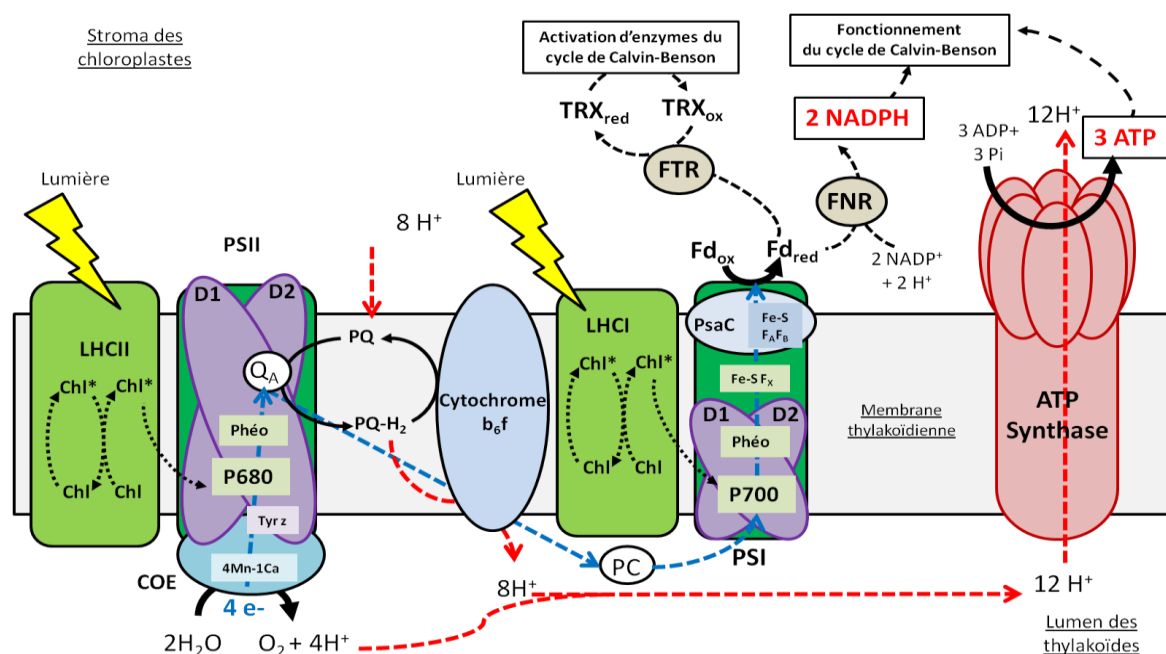
## I. La Photosynthèse

A la lumière, les feuilles de plantes de type  $C_3$  peuvent fixer le  $CO_2$  atmosphérique de façon directe *via* l'activité carboxylase de la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) pour produire du 3-phosphoglycérate (3-PGA), un acide phosphate qui sera par la suite converti en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), un sucre à trois carbones. Ces deux molécules vont servir de point de départ pour la biosynthèse de toutes les molécules organiques chez les plantes : les acides organiques et aminés, les sucres simples (glucose, fructose par exemple) et complexes (sucrose, amidon, paroi végétale par exemple), les acides ribonucléiques, les protéines, les lipides etc. Le processus de fixation de  $CO_2$  atmosphérique, appelé photosynthèse, peut être divisé en deux étapes distinctes, qui restent cependant fortement liées : la phase photochimique (dite « lumineuse ») et la phase de fixation de  $CO_2$  et régénération du ribulose-1,5-biphosphate (RuBP) via le cycle de Calvin-Benson (dite « sombre »).

### 1) La phase photochimique

Durant la phase photochimique, l'énergie lumineuse va être convertie en énergie chimique, qui sera par la suite utilisée par le cycle de Calvin-Benson pour la réduction du 3-PGA en G3P ainsi que pour la régénération du RuBP à partir de ce dernier. Cette conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique se fait grâce à la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique, située dans la membrane des thylakoïdes, localisés dans les chloroplastes des cellules végétales chlorophylliennes. Cette chaîne de transfert d'électrons est nécessaire à la production d'oxygène, à partir de l'oxydation de l'eau, et d'ATP et de NADPH. Cette production d'oxygène photosynthétique a joué un rôle déterminant dans le développement de la vie sur Terre.

Cette chaîne se compose de plusieurs complexes (Figure 1) : les photosystèmes I et II (PSI et PSII) auxquels sont associés les antennes collectrices I et II (LHCI et II), le complexe d'oxydation de l'eau (COE), et le cytochrome  $b_6f$  (pour une revue détaillée de la composition des PSI et II, voir Caffarri *et al.*, 2014). La lumière correspond à une émission d'ondes électromagnétiques de fréquences différentes, avec une énergie associée pour chaque fréquence (photons). Les photons peuvent être absorbés par les pigments chlorophylliens des végétaux, qui vont alors rentrer dans un état excité, relativement instable. Ces derniers



**Figure 1.** Schéma simplifié de la chaîne de transfert d'électrons chloroplastique associée à la production de NADPH et d'ATP. Chl : Chlorophylle ; LHC I et II : complexes des antennes collectrices des photosystèmes ; PSI et PSII : Photosystèmes I et II ; COE : complexe protéique d'oxydation de l'eau ;  $4Mn-1Ca$  : centre catalytique métallique du COE ; Tyr z : tyrosine de la protéine D1 ; P680 et P700 : dimères de chlorophylle a associées aux centres réactionnels des photosystèmes I et II, respectivement ; Phéo : phéophytine ;  $Q_A$  : Quinone A ; PQ : plastoquinone ; PC : Plastocyanine ;  $Fe-S$  ( $F_X$  et  $F_AF_B$ ) : centres fer-soufre ; Fd : Ferredoxine ; FNR : Ferredoxine Réductase à NADP ; FTR : Ferredoxine thiorédoxine réductase ; TRX : Thiorédoxine ; PsaC : accepteur terminal du PSI. Trait pointillé bleu : flux d'électrons. Trait pointillé rouge : flux de protons.

peuvent retourner à leur état énergétique fondamental en transférant l'excitation énergétique à des pigments voisins par résonnance énergétique ou bien en émettant de la fluorescence ou encore de la chaleur. Ils peuvent aussi changer leur structure chimique (conversion de l'énergie) et garder un état énergétique plus élevé (chlorophylle simplement excitée passant à un état triplement excitée).

Chez les végétaux, le PSII est associé à des antennes collectrices externes LHC II (Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3) ainsi que d'autres protéines périphériques (Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6 composées de chlorophylles (Chl) a et b ; CP43 et CP47 composées de Chl a), ainsi que de caroténoïdes (néoxanthine, violaxanthine, lutéine,  $\beta$ -carotène). Sous l'effet de l'excitation lumineuse, l'énergie transférée *via* les pigments arrive au cœur du centre réactionnel du PSII. Ce centre réactionnel se compose des protéines D1 (PsaA) et D2 (PsaB) qui contiennent deux dimères de Chl a (P680; absorbant la lumière à 680 nm), deux Chl « spéciales » (phéophytines (Phéo); ChlA<sub>0</sub>), deux  $\beta$ -carotènes, deux quinones (Q<sub>A</sub> et PQ), un atome de Fer, le cytochrome b<sub>559</sub> (cytb<sub>559</sub>) et le centre catalytique métallique (4Mn-1Ca) du COE.

Lorsque le P680 est excité, il va céder un électron à la Phéo de la protéine D1 (produisant une séparation de charge ; P680<sup>+</sup> Phéo<sup>-</sup>). A ce stade, le centre réactionnel est dit « fermé », c'est-à-dire qu'il ne peut plus accepter l'excitation qui vient des antennes collectrices LHCI et des pigments voisins (CP47, CP43, caroténoïdes). Puis l'électron cédé à la Phéo est transféré à la quinone Q<sub>A</sub> qui donne ensuite son électron à la plastoquinone PQ « mobile », préalablement fixée au site Q<sub>B</sub>, via l'intermédiaire d'un atome de Fer. Le P680<sup>+</sup> est ensuite réduit par un électron cédé par la tyrosine (Tyr z) de la protéine D1. La Tyr z avait auparavant été réduite par le centre catalytique (4Mn-1Ca) du COE. Puis le P680 redevient alors « ouvert » et peut de nouveau être excité. Pour deux molécules d'H<sub>2</sub>O oxydées par le COE, quatre électrons sont acceptés par le centre catalytique (4Mn<sup>+</sup>-1Ca) et vont participer au transfert de quatre électrons du P680 vers des PQ situées au niveau du site Q<sub>B</sub>. Chaque molécule de PQ peut accepter deux électrons formant ainsi du PQH<sub>2</sub>, puis elle se déplace vers le complexe du cytochrome b<sub>6</sub>f (cyt b<sub>6</sub>f), pour donner un électron à la plastocyanine (PC) *via* un centre fer-soufre (Fe-S) et le cyt f, et un électron au cyt b<sub>6</sub> pour réduire encore une PQ (Q-cycle). Le transfert d'électrons au niveau du complexe cyt b<sub>6</sub>f va permettre le transfert de protons à travers la membrane des thylakoides, protons qui seront par la suite utilisés par l'ATP synthase pour la production d'ATP.

L'énergie lumineuse peut aussi exciter les antennes collectrices du PSI (Lhca1, Lhca2, Lhca3, Lhca4). Le PSI est aussi associé avec d'autres protéines périphériques (PsaG, PsaH et PsaK). Le centre réactionnel du PSI se compose des protéines PsaA et PsaB qui contiennent deux dimères de Chl a (P700; absorbant la lumière à 700 nm), deux Phéo, deux quinones (PhQ<sub>A</sub>), un cluster Fe-S (Fx) et le cluster Fe-S (F<sub>A</sub>F<sub>B</sub>) de PsaC qui est l'accepteur terminal du PSI. Le cluster F<sub>A</sub>F<sub>B</sub> peut ensuite réduire la Ferrédoxine (Fd ; une protéine à Fe-S soluble). Donc, lors de l'excitation des antennes collectrices du complexe LHCI, l'énergie est transmise par résonnance au P700 pour former le P700<sup>+</sup> qui va réduire le cluster F<sub>A</sub>F<sub>B</sub> via la ChlA<sub>0</sub>, la PhQ<sub>A</sub> et le cluster Fx. La PC sert à réduire le P700<sup>+</sup> afin de « réouvrir » le centre réactionnel du PSI.

A ce stade, la Fd réduite peut être utilisée directement comme donneur d'électrons pour diverses enzymes chloroplastiques dont la Fd-réductase à NADP (FNR), la nitrite réductase (NiR), la Fd-glutamate synthase (Fd-GOGAT) mais aussi la Fd-thioredoxine reductase (FTR). La FNR permet de réduire le NADP<sup>+</sup> en NADPH. Par conséquent, la chaîne de transfert d'électron photosynthétique est le site majeur de production de pouvoir réducteur à la lumière. Ce pouvoir réducteur sera utilisé pour toutes les réactions NADPH-dépendantes dans le chloroplaste, incluant certaines étapes du cycle de Calvin-Benson. Il peut aussi être exporté vers d'autres compartiments via le shuttle « malate » (Heineke *et al.*, 1991).

Au cours du transfert d'électrons photosynthétique, des protons sont transférés entre le stroma et le lumen au travers des thylakoïdes. Pour deux molécules d'eau oxydées, le COE génère quatre protons, et le transfert de ces électrons *via* le cycle PQ/PQH<sub>2</sub> et le cytochrome b<sub>6</sub>f transportent huit protons du stroma vers le lumen. Ce gradient de protons à travers la membrane des thylakoïdes est utilisé par l'ATP synthase. Cette enzyme membranaire est constituée d'un stator et d'un rotor constitué de douze sous-unités. Le passage de protons *via* le stator fait tourner le rotor et produit trois molécules d'ATP à chaque tour (douze protons utilisés) à partir de trois molécules d'ADP et de trois phosphates inorganique (Pi). Ainsi, la phase photochimique permet de produire deux molécules de NADPH, trois molécules d'ATP et une molécule d'O<sub>2</sub> à partir de deux molécules d'eau et huit photons issus de la lumière qui ont été utilisés lors de l'excitation des antennes collectrices. L'ATP et le NADPH seront par la suite utilisés par le cycle de Calvin-Benson durant la phase « sombre » pour la réduction du 3-PGA en G3P ainsi que pour la régénération du RuBP, substrat de la RuBisCO. Par ailleurs, la production de Fd réduite par la chaîne de transfert d'électrons permet aussi d'activer/inactiver des enzymes *via* les thioredoxines, qui sont des protéines oxydoréductases

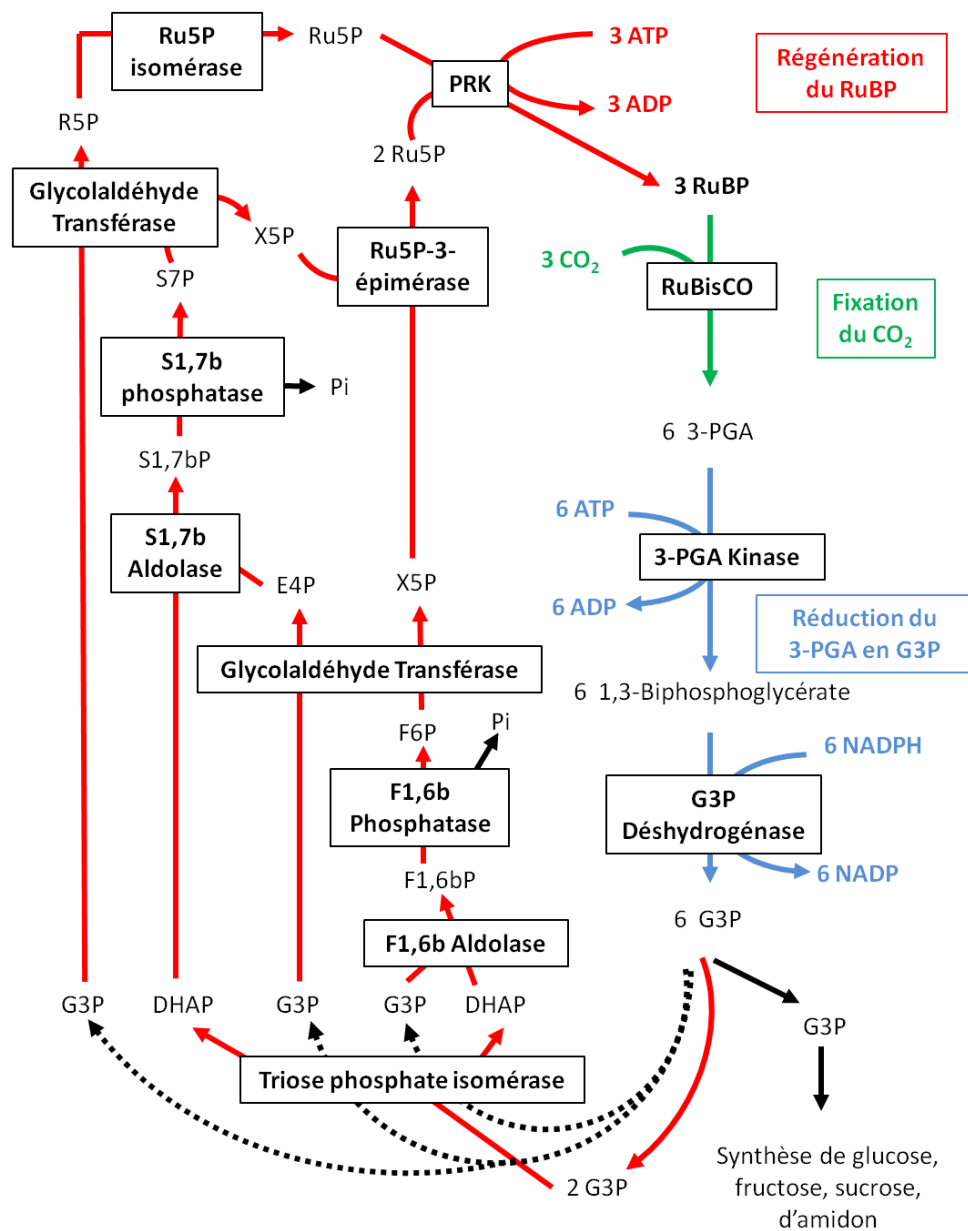
contenant deux cystéines rapprochées dans leur « site actif » et dont les groupements thiols peuvent s'oxyder pour former un pont disulfure. Il existe plusieurs types de thiorédoxines dont cinq sont chloroplastiques : f, m, x, y et z (les autres étant mitochondriales (o) et/ou cytosoliques (h)). Les thiorédoxines f, m, x, et y sont réduites par la FTR, et vont par la suite réduire des protéines cibles, notamment des enzymes (pour une revue voir Lemaire *et al.*, 2007). Plusieurs enzymes du cycle de Calvin-Benson sont activées à la lumière par les thiorédoxines f et/ou m : la fructose-1,6-biphosphatase (F1,6bPase) (Jacquot *et al.*, 1995; Hodges *et al.* 1994), la sedoheptulose-1,7-biphosphatase (S1,7bPase) (Schürmann et Jacquot, 2000), la Phosphoribulokinase (PRK) (Brandes *et al.*, 1996), et la G3P déshydrogénase (Sparla *et al.*, 2005). Il est possible que toutes les enzymes du cycle de Calvin soient régulées par des thiorédoxines (voir Lemaire *et al.*, 2007). La RuBisCO activase (Zhang et Portis, 1999), la malate déshydrogénase à NADP (Issakidis *et al.*, 1992; Hodges *et al.*, 1994) et l'ATP synthase (Schürmann et Jacquot, 2000) sont aussi « activées » par des thiorédoxines plastidiales.

Il existe aussi un système de transfert d'électrons chloroplastique cyclique qui ne fait pas intervenir le PSII et le cycle PQ/PQH<sub>2</sub> *via* le site Q<sub>B</sub>. Dans ce système, la Fd réduite est oxydée par la PQ par l'intermédiaire du cytochrome b<sub>6</sub>f, puis la PQH<sub>2</sub> formée cède un électron au cytochrome b<sub>6</sub>f, et un électron à la plastocyanine qui permettra de régénérer la Fd<sub>réduite</sub> *via* le PSI. Ce transfert cyclique permet de générer un potentiel électrochimique (gradient de pH) qui sert à la synthèse d'ATP indépendamment de la production de NADPH. (Pour une revue, voir Johnson, 2011).

## 2) La phase « sombre »

Durant la phase « sombre », le NADPH et l'ATP produits à la lumière par la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique vont être utilisés par le cycle de Calvin-Benson dans le stroma du chloroplaste. Ce cycle va permettre la fixation de CO<sub>2</sub> inorganique en matière organique. Il se compose de trois phases (Figure 2):

- La première étape est **la fixation** du CO<sub>2</sub>, réalisée par l'activité carboxylase de la RuBisCO qui va produire 6 molécules de 3-PGA à partir de 3 molécules de CO<sub>2</sub> et de 3 molécules de RuBP.
- La deuxième étape est **la réduction** des 6 molécules de 3-PGA en 1,3-biphosphoglycérate (1,3bPGA) par la 3-PGA kinase avec la consommation de 6 molécules d'ATP. Puis les 6



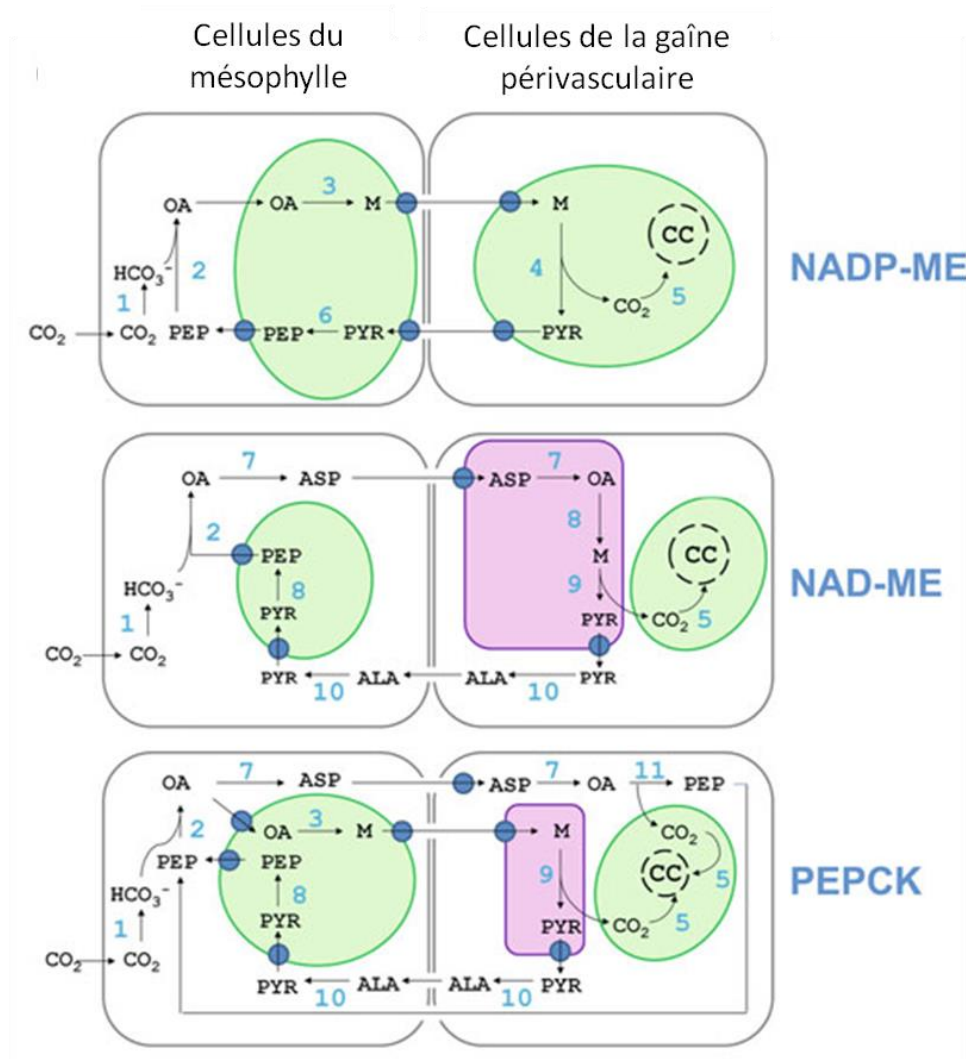
**Figure 2.** Schéma récapitulatif des étapes du cycle de Calvin-Benson. RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate ; 3-PGA, 3-phosphoglycérate ; G3P, glycéraldehyde-3-phosphate ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; F1,6bP, fructose-1,6-biphosphate ; F6P, fructose-6-phosphate ; X5P, xylulose-5-phosphate ; E4P, érythrose-4-phosphate ; S1,7bP, sédoheptulose-1,7-biphosphate ; S7P, sédoheptulose-7-phosphate ; R5P, ribose-5-phosphate ; Ru5P, ribulose-5-phosphate ; PRK, phosphoribulokinase.

molécules de 1,3bPGA sont réduites en 6 molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) par la G3P-déshydrogénase avec la consommation de 6 molécules de NADPH.

- La troisième étape consiste en **la régénération** des trois molécules de RuBP initialement utilisées par la RuBisCO à partir de 5 molécules de G3P. Ceci permet ainsi de conserver une molécule de G3P (gain de carbone) pour la synthèse de nombreuses molécules organiques. La régénération du RuBP fait intervenir 10 étapes enzymatiques :
  - 2 molécules de G3P sont isomérisées en 2 molécules dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par la triose phosphate isomérase.
  - 1 molécule de fructose-1,6-bisphosphate (F1,6bP) est synthétisée à partir de 2 molécules de DHAP et d'une molécule de G3P par une F1,6bP aldolase.
  - 1 molécule de F1,6bP est déphosphorylée en fructose-6-phosphate (F6P) par la F1,6bP phosphatase.
  - 1 molécule de F6P et 1 molécule de G3P sont transformées en 1 molécule d'érythrose-4-phosphate (E4P) et 1 molécule de xylulose-5-phosphate (X5P) par la glycolaldéhyde transférase.
  - 1 molécule de sédoheptulose-1,7-bisphosphate (S1,7bP) est synthétisée à partir de 1 molécule de E4P et 1 molécule de DHAP par une sédoheptulose-bisphosphate aldolase.
  - 1 molécule de S1,7bP est déphosphorylée en sédoheptulose-7-phosphate (S7P) par la sédoheptulose-1,7-bisphosphatase
  - 1 molécule de S7P et 1 molécule de G3P sont transformées en 1 molécule de R5P et 1 molécule de X5P par la glycolaldéhyde transférase
  - 2 molécules de X5P sont transformées en 2 molécules de Ru5P par la Ru5P-3-épimérase.
  - 1 molécule de R5P est isomérisée en 1 molécule de Ru5P par la Ru5P isomérase.
  - 3 molécules de Ru5P sont phosphorylées par la phosphoribulokinase avec la consommation de 3 molécules d'ATP pour former 3 molécules de RuBP.

Au cours d'un cycle, la consommation de 9 ATP, 6 NADPH et 3 molécules de CO<sub>2</sub> permet de produire 1 molécule de G3P (non-utilisée pour la régénération du RuBP). Cette molécule peut donc être utilisée dans diverses voies de biosynthèse par la plante. Elle servira notamment à la production d'amidon dans les chloroplastes, ou bien elle sera exportée dans le cytosol pour servir à la synthèse de saccharose.





**Figure 3.** Schéma des différentes voies métaboliques caractérisées pour la photosynthèse dite en C<sub>4</sub>.

1, anhydrase carbonique ; 2, PEPc ; 3, malate déshydrogénase à NADP (NADP-MDH) ; 4, enzyme malique à NADP (NADP-ME) ; 5, RuBisCO ; 6, pyruvate orthophosphate dikinase ; 7, aspartate aminotransférase ; 8, enzyme malique à NAD (NAD-ME) ; 9, malate déshydrogénase à NAD (NAD-MDH) ; 10, alanine aminotransférase ; 11, phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). OA, oxaloacétate ; M, malate ; PYR, pyruvate ; PEP, phosphoénolpyruvate ; ASP, aspartate ; ALA, alanine ; CC, Cycle de Calvin (Covshoff *et al.*, 2014).

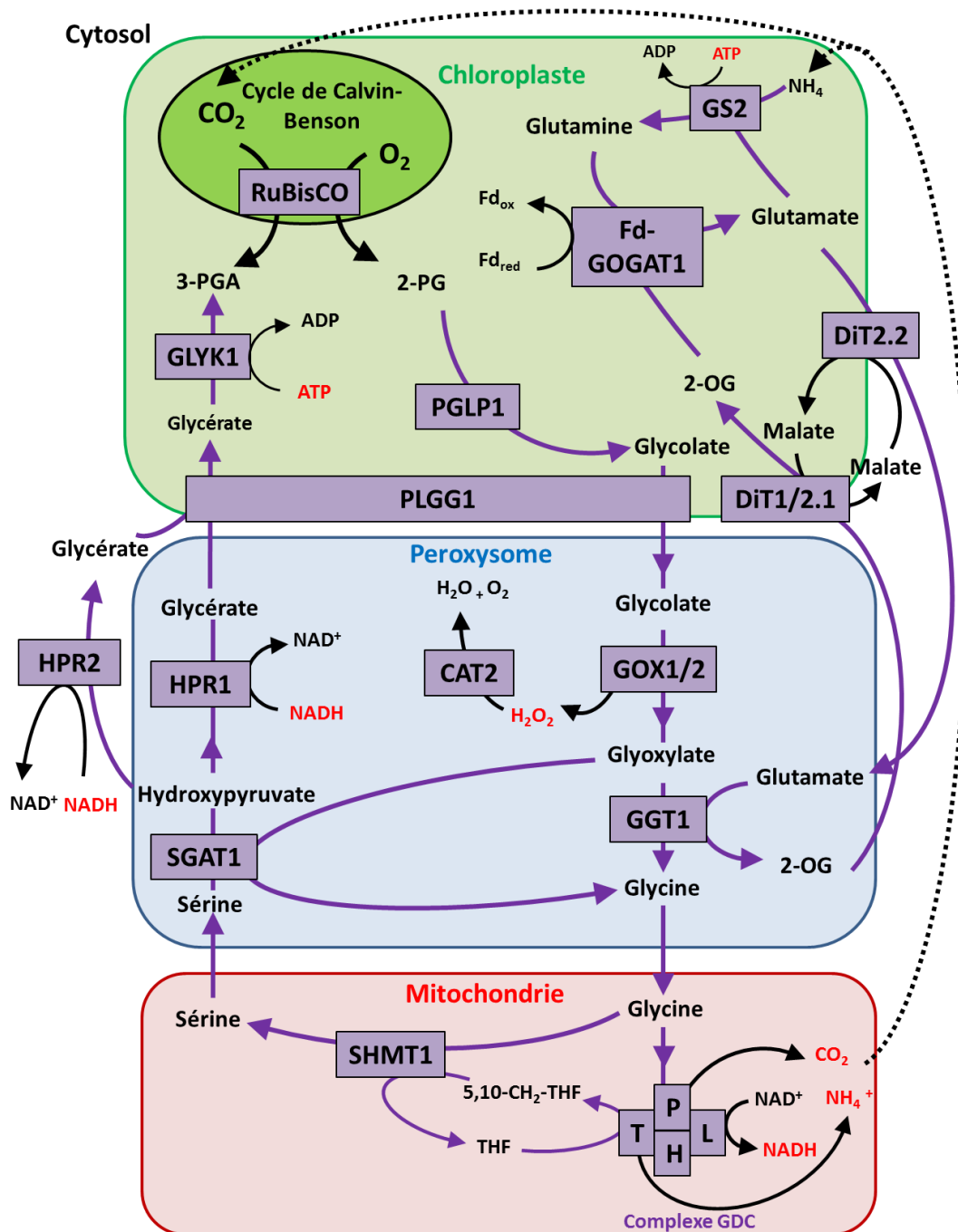


### 3) La photosynthèse chez les plantes en C<sub>4</sub>

Comme vu précédemment, chez les plantes en C<sub>3</sub>, la première enzyme responsable de la fixation du CO<sub>2</sub> atmosphérique sur de la matière organique est la RuBisCO. Il existe d'autres types de plantes dites C<sub>4</sub> (comme le maïs, le sorgho et le millet), où la première enzyme qui fixe le CO<sub>2</sub> atmosphérique sur la matière organique est la phosphoénolpyruvate (PEP) carboxylase (PEPc). Le PEP formé sera par la suite décarboxylé au voisinage de la RuBisCO, permettant ainsi d'augmenter l'activité carboxylase de la RuBisCO au détriment de l'activité oxygénase. Chez ces plantes, la photosynthèse est différenciée spatialement (et donne lieu à l'anatomie de Kranz (pour une revue, voir Sage *et al.*, 2014)). Le CO<sub>2</sub> atmosphérique est converti en HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> par une anhydrase carbonique afin d'être fixé sur un PEP par la PEPc pour former de l'oxaloacétate dans les cellules du mésophylle (OA ; un acide organique à 4 carbones d'où le terme de « plantes en C<sub>4</sub> »). Puis l'OA est converti *via* différentes voies en d'autres métabolites qui vont être transportés dans les cellules de la gaine périvasculaire afin d'être décarboxylés au voisinage de la RuBisCO. Par la suite, la photosynthèse est réalisée exactement de la même façon que chez les plantes en C<sub>3</sub>. Trois types de plantes en C<sub>4</sub> sont distingués dans la littérature, et diffèrent selon la nature du métabolite à quatre carbone qui est transporté entre les cellules du mésophylle et les cellules de la gaine périvasculaire ainsi que l'enzyme associée qui le décarboxyle (Figure 3) :

- Enzyme malique à NADP (NADP-ME).
- Enzyme malique à NAD (NAD-ME).
- Phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK).

Tous ces systèmes permettent de concentrer le CO<sub>2</sub> au voisinage de la RuBisCO, et donc d'augmenter la fixation de CO<sub>2</sub> par cette dernière. Ainsi, l'ouverture stomatique des plantes en C<sub>4</sub> est réduite pendant la journée, aboutissant à une réduction des pertes d'eau par transpiration. Ces plantes présentent donc un avantage dans une atmosphère chaude et un milieu sec par rapport aux plantes de type C<sub>3</sub>. Chez les espèces *Flaveria*, celles qui sont C<sub>4</sub>-like (mécanisme de concentration du CO<sub>2</sub> vers les cellules de la gaine périvasculaire) ont une efficacité d'utilisation d'eau (Water Use Efficiency, WUE) deux fois plus élevée que les C<sub>3</sub>-like, et ceci est corrélé avec une diminution de la conductance stomatique de ces feuilles (Kocacinar *et al.*, 2008). Il existe aussi d'autres types de plantes qui peuvent affronter des températures encore plus élevées que certaines plantes en C<sub>4</sub> pendant la journée : les plantes dites CAM (Crassulacean Acid Metabolism) ou crassulantes. Les stomates de ces plantes ne



**Figure 4.** Schéma de la photorespiration dans une cellule végétale chlorophyllienne. La voie photorespiratoire est représentée en violet. Les enzymes et transporteurs ayant une activité essentielle pour la photorespiration sont encadrés. RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; PGLP, 2-phosphoglycolate phosphatase; PLGG, transporteur plastidial glycolate glycérate; GOX, glycolate oxydase; CAT, catalase; GGT, glutamate:glyoxylate aminotransférase; GDC, glycine décarboxylase; SHMT, sérine hydroxyméthyl transférase; SGAT, sérine:glyoxylate aminotransférase; HPR, hydroxypyruvate réductase; GLYK, glycérate kinase; GS, glutamine synthétase; Fd-GOGAT, ferredoxine-glutamate synthase; DiT, transporteur de dicarboxylates; 2-OG, 2-oxoglutarate; THF, tétrahydrofolate; 5,10- $\text{CH}_2\text{-THF}$ , 5,10-méthylène-THF.

s'ouvrent que pendant la nuit, afin de limiter les pertes en eau pendant le jour. Durant la nuit, le  $\text{CO}_2$  atmosphérique est fixé sur un PEP, qui sera transformé en acide malique pour être stocké dans la vacuole. Puis, pendant le jour, cet acide est décarboxylé au voisinage de la RuBisCO afin de réaliser la photosynthèse.

## II. La Photorespiration

### 1) Description générale

La photorespiration est une voie majeure du métabolisme primaire chez l'ensemble des organismes chlorophylliens (embryophytes, algues, cyanobactéries). Elle découle de l'activité oxygénase de la RuBisCO, qui à partir d'une molécule d' $\text{O}_2$  et d'une molécule de RuBP, produit une molécule de 3-PGA et une molécule de 2-phosphoglycolate (2-PG). Cependant, ce dernier composé est toxique pour la plante : il a déjà été montré *in vitro* que le 2-PG inhibe la triose phosphate isomérase (enzyme du cycle de Calvin-Benson essentielle à la régénération du RuBP) purifiée à partir de feuilles chez *P. sativum* (Anderson, 1971). Dans l'air, la RuBisCO fixe environ une molécule d' $\text{O}_2$  pour 3 événements de carboxylation. Le rôle principal du métabolisme photorespiratoire consiste au recyclage du 2-PG en 3-PGA, une molécule qui pourra être métabolisée par le cycle de Calvin-Benson ou d'autres voies métaboliques de la plante. La photorespiration se déroule dans plusieurs compartiments subcellulaires: le chloroplaste, le peroxyosome, la mitochondrie ainsi que le cytosol (Figure 4). Au cours de ce cycle, le 2-PG produit par la RuBisCO est transformé en glycolate dans le chloroplaste, qui après transport dans le peroxyosome, est converti en glyoxylate (avec production d'une molécule de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) puis en glycine. La glycine est ensuite transportée dans les mitochondries pour être transformée en sérine, avec la production de  $\text{CO}_2$ , de  $\text{NH}_4^+$  et de NADH. Puis la sérine est transportée dans le peroxyosome pour être successivement transformée en hydroxypyruvate puis en glycérate avec consommation de NADH (il faut noter que la dernière réaction pourrait aussi avoir lieu dans le cytosol et le chloroplaste). Le cycle s'achève par la phosphorylation du glycérate en 3-PGA dans le chloroplaste avec consommation d'ATP. A partir de 2 molécules de 2-PG, le cycle photorespiratoire va produire une molécule de 3-PGA, deux molécules d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , avec la perte d'une molécule de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{NH}_4^+$  et la consommation d'un ATP, d'où le terme de photorespiration, car de l' $\text{O}_2$  est consommé et du  $\text{CO}_2$  est produit pendant le cycle (pour des revues sur ce cycle, voir Foyer *et al.*, 2009 ; Bauwe *et al.*, 2010).

La photorespiration pourrait être vue comme un processus néfaste pour la plante car elle consomme de l'énergie sous forme d'ATP et elle libère du carbone et de l'azote déjà assimilés, sous forme de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{NH}_4^+$ . De plus, l'activité oxygénase de la RuBisCO est en compétition avec l'activité carboxylase, puisque le site de fixation du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{O}_2$  est le même (Tcherkez *et al.*, 2006). Cela diminue donc la possibilité de fixer le  $\text{CO}_2$ . Cependant, une partie du  $\text{CO}_2$  photorespiratoire produit par l'activité de la glycine décarboxylase (GDC) serait réassimilée par la RuBisCO, puis l'ammonium produit par cette même enzyme serait en partie réassimilé par l'activité de la glutamine synthétase chloroplastique (GS2 ; Wallsgrave *et al.*, 1987). La photorespiration pourrait aussi jouer un rôle important dans le bon fonctionnement du cycle de Calvin-Benson, via le recyclage du carbone du glycolate pour la régénération du RuBP (Servaites et Ogren, 1977).

Suite à une mutagenèse chimique sur graines, les premiers mutants pour des enzymes photorespiratoires chez *Arabidopsis thaliana* (*CS119*, *sat*, *stm* et *glyD* pour la phosphoglycolate phosphatase, la sérine:glyoxylate aminotransférase (SGAT), la sérine hydroxyméthyl transférase (SHMT), et la protéine P du complexe glycine décarboxylase (GDC), respectivement) ont été identifiés par Somerville et ses collaborateurs (Somerville et Ogren, 1979, 1980, 1981 et 1982). En effet, l'inhibition de la photorespiration inhibait l'activité photosynthétique, mais uniquement dans des conditions photorespiratoires (air ambiant) comparé à une atmosphère riche en  $\text{CO}_2$  (Servaites et Ogren, 1977). Ainsi, après quatre jours de transfert d'une atmosphère riche en  $\text{CO}_2$  ( $0.1 \text{ mL.L}^{-1}$ ) à l'air ambiant, les mutants présentaient un phénotype dit « photorespiratoire » : de la chlorose et un arrêt de la croissance dans l'air, qui étaient absents lorsque les plantes étaient cultivées en condition de fort  $\text{CO}_2$ . Aussi, les mutants photorespiratoires *CS119*, *sat*, *stm* et *glyD* présentaient une rapide inhibition de leur assimilation nette de  $\text{CO}_2$  à la lumière dans de l'air avec 50%  $\text{O}_2$ , mais celle-ci était absente avec 2%  $\text{O}_2$  par rapport aux contrôles (Somerville et Ogren, 1979, 1980, 1981 et 1982). Ce phénotype pourrait refléter l'importance du recyclage du carbone du 2-PG vers le 3-PGA pour le cycle de Calvin-Benson, mais aussi l'importance des interactions entre la photorespiration et d'autres voies métaboliques comme la biosynthèse de glycine et de sérine, le métabolisme  $\text{C}_1$ , le cycle de Krebs et l'assimilation de l'azote. Ces aspects seront développés dans le chapitre « Interactions ».

La photorespiration pourrait aussi jouer un rôle important lors de stress biotiques (reconnaissance plante-pathogène impliquant un burst oxydatif par exemple) et abiotiques

(froid, sécheresse, stress salin par exemple) impliquant la fermeture stomatique. En effet, cette fermeture entraîne une diminution de la concentration de  $\text{CO}_2$  dans les cellules qui réduit la fixation de  $\text{CO}_2$  par la RuBisCO et donc augmente l'activité oxygénase. Le maintien d'une activité RuBisCO *via* le recyclage du carbone photorespiratoire pour la régénération du RuBP permettrait d'utiliser l'ATP et le NADPH produits par la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique et donc de réduire la production de formes réactives de l'oxygène (ROS-« Reactive Oxygen Species ») au niveau de cette chaîne, qui sont toxiques pour la plante. Par ailleurs, il a récemment été montré que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  produit par la photorespiration joue un rôle dans la mise en place des réponses aux attaques de pathogènes (Rojas *et al.*, 2012).

Chez les plantes en  $\text{C}_4$ , l'intensité photorespiratoire serait plus faible par rapport aux plantes en  $\text{C}_3$ . En effet, le système de concentration de  $\text{CO}_2$  au voisinage de la RuBisCO va diminuer fortement l'activité oxygénase de la RuBisCO au profit de l'activité carboxylase. Il a déjà été montré que la quantité de  $\text{CO}_2$  atmosphérique nécessaire à la photosynthèse pour compenser des pertes de  $\text{CO}_2$  photorespiratoires et respiratoires à la lumière (point de compensation  $\Gamma$ ) était 4 à 5 fois plus faible chez le Sorgho (espèce  $\text{C}_4$ ) que chez le tournesol (espèce  $\text{C}_3$ ) (Laisk et Edwards, 1998). Ces résultats indiquent un cycle photorespiratoire et/ou respiratoire réduit chez le Sorgho (Laisk et Edwards, 1998). Cependant, bien que faible, l'activité photorespiratoire chez les plantes en  $\text{C}_4$  est essentielle, puisqu'un mutant pour la glycolate oxydase (GOX; enzyme photorespiratoire) a été identifié chez le maïs, et il présente un fort retard de croissance dans l'air qui ne se manifeste pas quand les plantes sont dans un atmosphère enrichie en  $\text{CO}_2$  (Zelitch *et al.*, 2009).

## 2) Les enzymes et les transporteurs du cycle photorespiratoire chez *Arabidopsis thaliana*

Le recyclage du carbone du 2-PG en 3-PGA implique huit enzymes clés (Figure 4): la phosphoglycolate phosphatase (PGLP), la GOX, la glutamate:glyoxylate aminotransférase (GGT), le complexe GDC, la SHMT, la SGAT, l'hydroxypyruvate reductase (HPR) et la D-glycérate 3-kinase (GLYK). A ces enzymes s'ajoutent des transporteurs de métabolites entre les différents compartiments subcellulaires, qui restent encore peu connus, ainsi que des enzymes impliquées dans la métabolisation des produits de la photorespiration : la catalase (CAT) pour l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , le cycle glutamine synthétase/glutamate synthase (GS/GOGAT) pour le  $\text{NH}_4^+$  et la RuBisCO pour le  $\text{CO}_2$ . Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la

**Tableau 1.** Récapitulatif des gènes codant des enzymes photorespiratoires chez *A. thaliana*.

Enzymes	Nom du gène	Locus	Références pour les mutants identifiés chez <i>A. thaliana</i>
Production du 2-PG			
RuBisCO	<i>RBCS1A</i>	At1g67090	Non connu à l’heure actuelle
	<i>RBCS1B</i>	At5g38430	
	<i>RBCS2B</i>	At5g38420	
	<i>RBCS3B</i>	At5g38410	
	<i>RBCL</i>	AtCG00490	
Recyclage du carbone du 2-PG dans le 3-PGA			
Phosphoglycolate phosphatase	<i>PGLP1</i>	At5g36700	Schwarte et Bauwe, 2007
Transporteur plastidial de glycolate-glycérate	<i>PLGG1</i>	At1g32080	Pick <i>et al.</i> , 2013
Glycolate oxydase	<i>GOX1</i>	At3g14420	Rojas <i>et al.</i> , 2012 Mes travaux de thèse
	<i>GOX2</i>	At3g14415	
Glutamate:glyoxylate aminotransférase	<i>GGT1</i>	At1g23310	Igarashi <i>et al.</i> , 2003 Dellero <i>et al.</i> , 2015b
Glycine décarboxylase	<i>GDP1</i>	At2g26080	Engel <i>et al.</i> , 2007
	<i>LPD1</i>	At1g48030	Non connu à l’heure actuelle
	<i>LPD2</i>	At3g17240	
	<i>GDT</i>	At1g11860	
	<i>GDH1</i>	At2g35370	
	<i>GDH2</i>	At2g35120	
	<i>GDH3</i>	At1g32470	
Sérine hydroxyméthyl transférase	<i>SHMT1</i>	At4g37930	Engel <i>et al.</i> , 2011
Sérine:glyoxylate aminotransférase	<i>SGAT1</i>	At2g13360	Somerville et Ogren, 1980
Hydroxypyruvate déshydrogénase	<i>HPR1</i>	At1g68010	Timm <i>et al.</i> , 2011
	<i>HPR2</i>	At1g79870	
	<i>HPR3</i>	At1g12550	
Glycérate kinase	<i>GLYK1</i>	At1g80380	Boldt <i>et al.</i> , 2005
Réassimilation de l'azote photorespiratoire			
Transporteur plastidial de dicarboxylate	<i>DiT1</i>	At5g12860	Taniguchi <i>et al.</i> , 2002
	<i>DiT2.1</i>	At5g64290	Somerville et Ogren, 1983
Glutamate synthase	<i>Fd-GOGAT1</i>	At5g04140	Coshigano <i>et al.</i> , 1998
Glutamine synthétase	<i>GS2</i>	At5g35630	Wallsgrove <i>et al.</i> , 1987
Détoxification du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> photorespiratoire			
Catalase	<i>CAT2</i>	At4g35090	Queval <i>et al.</i> , 2007

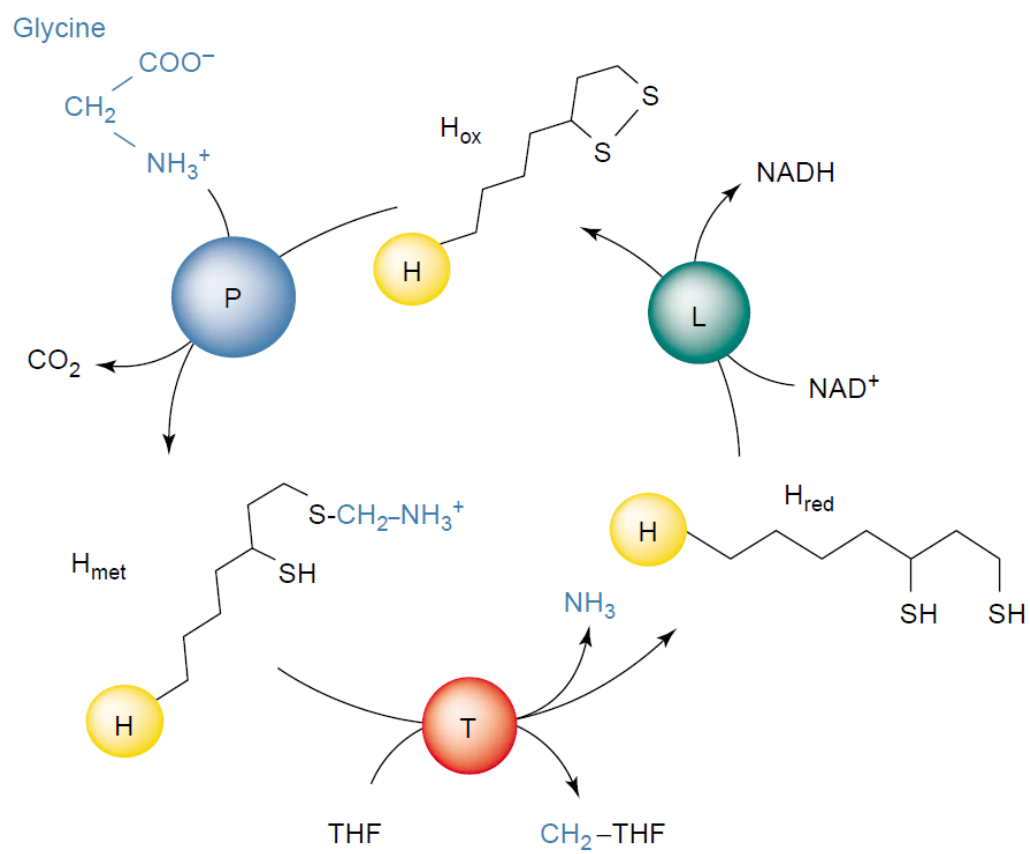
photorespiration chez *A. thaliana* ont été identifiés pour la plupart par l'apparition d'un phénotype photorespiratoire dans l'air décrit auparavant (chlorose, retard de croissance), ou bien suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air (pour des revues, voir Foyer *et al.*, 2009 et Timm et Bauwe, 2013). Un récapitulatif de l'ensemble des gènes cités dans cette section est disponible dans le Tableau 1.

#### a) Enzymes clés associées au recyclage du 2-PG en 3-PGA

**La phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18 ; PGLP).** Elle catalyse la déphosphorylation du 2-PG en glycolate dans le chloroplaste. D'après Swartz et Bauwe (2007), treize gènes codent pour des PGLP putatives chez *A. thaliana* dont sept sont prédites d'être chloroplastiques (At1g56500, At3g10970, At3g48420, At4g25840, At4g39970, At5g36700, and At5g36790). Pour deux de ces gènes (*PGLP1*, At5g36700; *PGLP2*, At5g47760), les enzymes recombinantes présentent une activité PGLP. L'analyse de mutants « knock-out » pour ces deux PGLP (*pglp1-1* et *pglp2-1*) a révélé un fort retard de croissance dans l'air pour le mutant *pglp1-1* mais pas pour *pglp2-1*. Seul le mutant *pglp1-1* présentait une activité PGLP foliaire réduite par rapport au contrôle (40 fois plus faible). Le mutant *pglp1-1* peut survivre avec 3 mL.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> dans l'air, cependant pour retrouver une croissance comparable au sauvage, il fallait 9 mL.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> dans l'air (Schwartz et Bauwe, 2007). Un mutant EMS *CS119* avait déjà été identifié avec une faible activité PGLP (Somerville et Ogren, 1979), cependant la mutation n'avait pas été cartographiée à l'époque. Depuis, il a été montré que le gène muté était bien *PGLP1* (Schwartz et Bauwe, 2007). Ainsi, *PGLP1* serait le gène majoritairement impliqué dans la photorespiration.

**La glycolate oxydase (EC 1.1.3.15 ; GOX).** Elle catalyse l'oxydation du glycolate en glyoxylate, avec la production de peroxyde d'hydrogène, dans le peroxyosome. Cette enzyme étant au cœur de mon sujet de thèse, elle sera décrite en détail dans la section correspondante (chapitre « la glycolate oxydase »).

**La glutamate:glyoxylate aminotransférase (EC 2.6.1.4 ; GGT).** Elle catalyse le transfert d'un groupement amide du glutamate vers le glyoxylate pour former une molécule de glycine, et une molécule de 2-OG. Cette enzyme étant aussi au cœur du sujet de ma thèse, elle sera décrite en détail dans la section correspondante (chapitre « la glutamate:glyoxylate aminotransférase »).



**Figure 5.** Schéma du fonctionnement du complexe GDC (Douce *et al.*, 2001)



**Le complexe glycine décarboxylase (GDC).** Il catalyse, dans la mitochondrie, la formation d'une molécule de 5,10-méthylène-THF, à partir d'une molécule de glycine, de THF et de  $\text{NAD}^+$ , avec la production d'une molécule de  $\text{CO}_2$ , de  $\text{NH}_4^+$  et de NADH. Ce complexe se compose de quatre types de sous-unités dont trois enzymes qui sont appelées P (EC 1.4.4.2, GDP; homodimère de 200 kDa), T (EC 2.1.2.10, GDT; monomère de 100 kDa), et L (EC 1.8.1.4, LPD; homodimère de 45 kDa) associées à une protéine H (GDH; sous-unité de 14 kDa). La glycine est d'abord fixée par la sous-unité P, afin d'être décarboxylée en aminométhylène. Ce dernier est directement fixé par un groupement thiol de l'acide lipoïque de la protéine H. Puis la sous-unité P transfère le groupement méthylène sur le cofacteur THF, pour former le 5,10-méthylène-THF, et le groupement amine est relâché sous forme de  $\text{NH}_4^+$ . La protéine L réoxyde l'acide lipoïque de la protéine H via son cofacteur, la flavine adénine dinucléotide (FAD), pour former le  $\text{FADH}_2$ , qui va être directement réoxydé par le  $\text{NAD}^+$  pour former une molécule de NADH et un proton (Figure 5) (voir Bauwe et Kolukisaoglu, 2003). Chez *A. thaliana*, deux gènes codent la protéine P (*GDP1*, At4g33010 ; *GDP2*, At2g26080), deux gènes codent la protéine L (*LPD1*, At3g17240 ; *LPD2*, At1g48030), trois gènes codent la protéine H (*GDH1*, At2g35370 ; *GDH2*, At2g35120 ; *GDH3*, At1g32470) et un gène code la protéine T (*GDT1*, At1g11860). Les gènes *LPD2* et *GDH2* codent des protéines prédites pour être adressées uniquement aux mitochondries tandis que les protéines codées par les autres gènes sont prédites pour être adressées en plus aux chloroplastes, ou bien au cytosol d'après les travaux d'Engel *et al* (2007). Les simples mutants « knock-out » pour la protéine P (*gldp1-1*, *gldp1-2*, *gldp2-2* et *gldp2-3*) ne montrent pas de phénotype dans l'air. Cependant, après un traitement de 4h à 4°C et sous une forte intensité lumineuse ( $800\text{-}1000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) afin d'augmenter la photorespiration, les deux mutants *gldp1-1* et *gldp1-2* accumulent 4 fois plus de glycine par rapport au contrôle et aux mutants *gldp2*. Ces résultats montrent que malgré la redondance fonctionnelle de ces gènes, *GDP1* aurait une contribution plus importante dans la photorespiration que *GDP2*. La combinaison des mutants *gldp1-1xgldp2-2* homozygote ne permet pas de produire des plantes viables dans l'air (absence de germination), mais aussi en fort  $\text{CO}_2$  ( $9 \text{ mL.L}^{-1}$ ) sur milieu MS + 2% sucrose (arrêt de la croissance au stade deux cotylédons puis mort après 3-4 semaines). Ce fort phénotype serait lié à l'altération trop importante du métabolisme  $\text{C}_1$  chez ces plantes (voir Engel *et al.*, 2007).

**La sérine hydroxyméthyl transférase (EC 2.1.2.1 ; SHMT).** Elle catalyse le transfert d'un groupement hydroxyméthyl du 5,10-méthylène-THF (produit par le complexe GDC) sur une

molécule de glycine pour former une molécule de sérine. Chez *A. thaliana*, sept gènes codent pour des SHMT dont deux pour des SHMT mitochondriales (*SHMT1*, At4g37930; *SHMT2*, At5g26780), les autres étant prédites pour être adressées au chloroplaste et/ou au cytosol. L'activité SHMT mesurée sur des fractions subcellulaires issues de feuilles de *Pisum sativum* a montré que les mitochondries présentaient dix fois plus d'activité « SHMT » que d'autres compartiments cellulaires (Neuburger *et al.*, 1996). Des expériences d'immunolocalisation ont montrées que la protéine SHMT1 (sous-unité de 57 kDa) était localisée dans les mitochondries des cellules du mésophylle et des tissus vasculaires tandis que la protéine SHMT2 (sous-unité de 59 kDa) était uniquement localisée dans les tissus vasculaires (Engel *et al.*, 2011). Le rôle du gène *SHMT1* dans la photorespiration avait déjà été démontré auparavant (mutant *stm* ; Somerville et Ogren, 1981) et récemment confirmé par l'analyse d'un autre mutant *shm1-1* (Engel *et al.*, 2011). Le mutant *shm1-1* présentait des symptômes similaires au phénotype photorespiratoire après deux semaines de transfert de fort CO<sub>2</sub> (1,5 mL.L<sup>-1</sup>) dans l'air (retard de croissance, jaunissement prématuré des feuilles âgées) avec 50% d'activité foliaire SHMT en moins par rapport au contrôle, dont une extinction quasi-totale de l'activité SHMT mitochondriale des cellules du mésophylle. Par ailleurs, ce mutant assimile 4 fois moins de CO<sub>2</sub>, et accumule 100 fois plus de glycine par rapport au contrôle, après seulement 5 jours de transfert de fort CO<sub>2</sub> à l'air. Par contre, le mutant *shm2-2* se comporte comme des plantes sauvages (au niveau de son phénotype, son assimilation de CO<sub>2</sub>, ses quantités de glycine et de sérine). Ceci suggère un rôle non-photorespiratoire pour le gène *SHMT2*. Le double mutant *shm1-1xshm2-2* n'est pas viable dans l'air (pas de germination) ou en fort CO<sub>2</sub> (9 mL.L<sup>-1</sup>; mort après le développement de quelques feuilles jaunes). Ces dernières données montrent qu'il y a une redondance fonctionnelle des protéines SHMT1 et SHMT2 dans le métabolisme C<sub>1</sub> pour le maintien du développement et la croissance des plantes (voir Engel *et al.*, 2011).

**La sérine:glyoxylate aminotransférase (EC 2.6.1.45; SGAT).** Elle catalyse, dans le peroxysome, le transfert d'un groupement amide de la sérine vers le glyoxylate pour former une molécule de glycine et une molécule d'hydroxypyruvate. Chez *A. thaliana*, un gène (*SGAT1*, At2g13360) code cette enzyme. Des expériences de northern-blot ont montré que ce gène était fortement exprimé dans les feuilles et les cotylédons d'*A. thaliana*. La protéine recombinante associée (sous-unité de 44 kDa) peut réaliser trois types d'activités aminotransférases (alanine:glyoxylate, sérine:glyoxylate et sérine:pyruvate) *in vitro*, avec 5 fois plus d'activité sérine:glyoxylate aminotransférase par rapport aux autres (Liepman et

Olsen, 2001). Trois mutants « knock-out » pour ce gène ont été identifiés (*CS51* (renommé *sat* par la suite), *CS108* et *CS117*) et ils présentent un phénotype photorespiratoire (Somerville et Ogren, 1980b). Par ailleurs, les feuilles du mutant *sat* assimilaient 3 fois moins de CO<sub>2</sub> par rapport aux plantes sauvages. Chez ces trois mutants, la glycine et la serine s'accumulaient tandis les quantités d'amidon et de saccharose diminuaient par rapport aux plantes sauvages (Somerville et Ogren, 1980b).

**L'hydroxypyruvate réductase (EC 1.1.1.29 ; HPR).** Elle catalyse la réduction de l'hydroxypyruvate en glycérate, à l'aide du NADH. Chez *A. thaliana*, 3 gènes codent cette enzyme (*HPR1*, At1g68010; *HPR2*, At1g79870; *HPR3*, At1g12550). La protéine HPR1 (sous-unité de 42 kDa) est peroxysomale, tandis que HPR2 (sous-unité de 34 kDa) est cytosolique et HPR3 (sous-unité de 35 kDa) est plastidiale. Les protéines recombinantes associées peuvent réaliser les activités hydroxypyruvate réductase et glyoxylate réductase *in vitro*, en utilisant soit du NADH soit du NADPH. Cependant, l'activité hydroxypyruvate réductase utilisant le NADH par la protéine HPR1 est au moins 20 fois plus importante *in vitro* que les autres activités à NADPH réalisées par HPR1, HPR2 ou HPR3 (Timm *et al.*, 2008). Pour la HPR1 et la HPR2, ces activités ont été confirmées *in planta* en les mesurant à partir de feuilles des mutants *hpr2-1*, *hpr1-1* et *hpr1-1xhpr2-1*. Par contre, l'activité glyoxylate réductase de la protéine recombinante HPR3 était deux fois plus importante que son activité hydroxypyruvate réductase (Timm *et al.*, 2011). Des expériences de RT-PCR ont montré que les gènes *HPR1* et *HPR2* sont plus exprimés dans les feuilles que les racines, avec une plus grande expression de *HPR1* par rapport à *HPR2* dans les différents organes aériens (feuilles de rosettes, feuilles caulines, siliques, fleurs, tiges). Le mutant *hpr1-1* présente un léger retard de croissance tandis que le double mutant *hpr1-1xhpr2-1* présente un retard plus marqué après 6 semaines de croissance dans l'air. Dans des conditions similaires, le triple mutant *hpr1-1xhpr2-1xhpr3-1* présente un retard de croissance encore plus marqué que les deux autres mutants cités. Ce phénotype était absent dans des conditions de culture en fort CO<sub>2</sub> (1 mL.L<sup>-1</sup>) pour chaque mutant. Par contre, les mutants *hpr2-1* et *hpr3-1* ne montrent pas de phénotype par rapport au contrôle dans l'air. L'ensemble de ces mutants, sauf *hpr3-1*, présentent une plus faible assimilation de CO<sub>2</sub> dans l'air. Les mutants *hpr1-1*, *hpr1-1xhpr2-1* et *hpr1-1xhpr2-1xhpr3-1* accumulent 6 fois plus de glycine et 15 fois plus de sérine lorsqu'ils sont dans l'air, par rapport à la condition de fort CO<sub>2</sub>. L'ensemble de ces résultats démontre un rôle majoritaire du gène *HPR1* dans la photorespiration, et un rôle secondaire des gènes *HPR2* et *HPR3* (Timm *et al.*, 2011).

**La D-glycérate 3-kinase (EC 2.7.1.31 ; GLYK).** Cette protéine de 39 kDa catalyse, dans le chloroplaste, le transfert d'un groupement phosphate, issu d'une molécule d'ATP, sur le glycérate, pour produire une molécule de 3-PGA. Chez *A. thaliana*, un seul gène code cette enzyme (*GLYK1*, At1g80380). Il a été identifié à partir de séquences protéiques partielles obtenues sur l'enzyme purifiée de feuilles d'*Arabidopsis* (Boldt *et al.*, 2005). Les mutants *glyk1-1* et *glyk1-2* ne sont pas viables dans l'air (arrêt de la croissance au stade de 2 cotylédons) mais se développent normalement en conditions de fort CO<sub>2</sub> (1,2 mL.L<sup>-1</sup>). Ces mutants ne présentent pas d'activité GLYK dans les feuilles, mais une forte accumulation de glycérate par rapport au contrôle (100 fois plus) en conditions de fort CO<sub>2</sub>. L'ensemble de ces données confirment que *GLYK1* est le seul gène codant une protéine ayant une activité glycérate kinase impliquée dans la photorespiration dans les feuilles d'*Arabidopsis*. Une analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés de glycérate kinases de plusieurs espèces et de plusieurs familles a montré que la GLYK de plante appartenait à un cluster spécifique, qui diffère des GLYK d'animaux et de bactéries (voir Boldt *et al.*, 2005).

#### **b) Les transporteurs de métabolites photorespiratoires**

Le fonctionnement du cycle photorespiratoire nécessite le transport de nombreux métabolites au travers des membranes des compartiments subcellulaires. A ce jour, seulement trois transporteurs, localisés dans les chloroplastes, ont été identifiés comme jouant un rôle déterminant pour le cycle photorespiratoire.

**Le transporteur plastidial glycolate-glycérate (PLGG).** Il transporte le glycolate du chloroplaste vers le cytosol, en antiport avec le glycérate. Le gène (*PLGG1*, At1g32080) codant cette enzyme (sous-unité de 54 kDa) chez *A. thaliana* a été identifié par une approche gène candidat suivant une analyse de coexpression avec 11 gènes photorespiratoires pour rechercher des transporteurs du cycle photorespiratoire (Pick *et al.*, 2013). Parmi les gènes co-exprimés, seul le gène *PLGG1* codait une protéine avec de nombreuses (12) hélices transmembranaires prédites. Suite à l'expression transitoire d'une protéine de fusion PLGG1-GFP dans des protoplastes de tabac, elle a pu être localisée dans l'enveloppe des chloroplastes. Le mutant « knock-out », *plgg1-1*, présente un léger retard de croissance avec 3 mL.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> dans l'air par rapport au contrôle et de nombreuses tâches de chlorose après une semaine de transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. L'activité du transporteur a été mise en évidence *in vitro* en utilisant des liposomes contenant l'enzyme recombinante, et en mesurant la quantité de <sup>14</sup>C-glycérate transporté de l'extérieur vers l'intérieur du liposome. Puis cette

activité a été confirmée par des analyses d'incorporation de  $^{18}\text{O}$  dans du glycérate en utilisant des chloroplastes isolés de plantes *plgg1-1* et sauvages. Par la suite, la forte accumulation de glycolate et de glycérate par rapport à d'autres métabolites photorespiratoires dans les feuilles du mutant, avant et après transfert de fort  $\text{CO}_2$  à l'air, a confirmé le transport du glycolate et du glycérate par cette enzyme (Pick *et al.*, 2013).

**Les transporteurs de dicarboxylates (DiT).** Ces transporteurs sont nécessaires pour le bon fonctionnement du cycle GS/GOGAT ainsi que les échanges de 2-OG et de glutamate entre le cytosol et le chloroplaste. Dans le cadre de la photorespiration, ils sont importants pour l'activité de la protéine GGT1, ainsi que pour la réassimilation de l'ammonium produit par le complexe GDC. Chez *A. thaliana*, les transporteurs DiT sont codés par 3 gènes (*DiT1*, At5g12860 = OMT1; *DiT2.1*, At5g64290 = DCT1; *DiT2.2*, At5g64280 = DCT2) et les protéines associées (*DiT1*, sous-unité de 59 kDa ; *DiT2.1*, sous-unité de 60 kDa ; *DiT2.2*, sous-unité de 58 kDa) sont toutes adressées à la membrane de l'enveloppe interne des chloroplastes. Un mutant *CS156* (*dct* à l'époque) a été identifié chez *A. thaliana* à cause de son phénotype photorespiratoire (Somerville et Ogren, 1983). Par la suite, la mutation a été cartographiée dans le gène *DiT2.1* (Renné *et al.*, 2003). De plus, le phénotype du mutant *dct* pouvait être complété par l'expression du gène *DiT2* de l'épinard (Renné *et al.*, 2003). Des expériences de marquages au  $^{14}\text{CO}_2$  en conditions photorespiratoires ont montré que ce mutant accumulait beaucoup de  $^{14}\text{C}$  dans le 2-OG, et peu dans la glycine, la sérine et le glutamate par rapport au contrôle. Il a été suggéré que la protéine transportait du 2-OG et du glutamate à travers l'enveloppe chloroplastique et qu'elle était associée avec le métabolisme azoté photorespiratoire (Renné *et al.*, 2003). Par la suite, l'analyse du transport de carboxylates avec du malate en utilisant des liposomes reconstitués contenant les protéines recombinantes *DiT1* et *DiT2.1* (OMT1 et DCT1 auparavant) a mis en évidence le transport du 2-OG en antiport avec le malate pour la protéine *DiT1* (Renné *et al.*, 2003), et le transport du glutamate en antiport avec le malate pour la protéine *DiT2.1* (Taniguchi *et al.*, 2002) (voir le modèle, Figure 4). Les mutants « knock-out » *omt1-T1* et *omt1-T2* sont viables dans l'air tandis que les mutants *dct1-T1* et *dct1-T2* présentent un phénotype photorespiratoire (Taniguchi *et al.*, 2002). Cependant, l'extinction de l'expression du gène codant *DiT1* par ARN interférence chez le tabac provoque un phénotype photorespiratoire, avec une plus faible assimilation nette de  $\text{CO}_2$  dans l'air, ainsi qu'une augmentation de la quantité d'ammonium et de glyoxylate foliaire (Schneidereit *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données démontre un rôle photorespiratoire essentiel pour les protéines *DiT1* et *DiT2.1*.

### c) Enzymes impliquées dans le recyclage des produits de la photorespiration

Lors du cycle photorespiratoire, de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est produit dans le peroxysome par la GOX, et du  $\text{CO}_2$  et du  $\text{NH}_4^+$  sont libérés dans la mitochondrie par le complexe GDC. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  étant toxique pour les plantes (stress oxydant), il doit être detoxifié. Le carbone et l'azote produits par le complexe GDC représentent des pertes importantes, et à ce titre, leur réassimilation est également importante. Le recyclage de ces produits issus de la photorespiration serait crucial pour le bon fonctionnement du cycle, puisque des mutants pour ces enzymes ont un phénotype photorespiratoire dans l'air chez *A. thaliana*, qui est absent en conditions de fort  $\text{CO}_2$ .

**La glutamate synthase (GOGAT).** Elle catalyse le transfert d'un groupement amide de la glutamine sur le 2-OG pour former deux molécules de glutamate, *via* l'utilisation de pouvoir réducteur sous forme de ferredoxine (Fd-GOGAT ; EC 1.4.7.1) ou sous forme de NADH (NADH-GOGAT ; EC 1.4.1.14). Chez *A. thaliana*, 2 gènes codent l'enzyme ferredoxine-dépendante (*Fd-GOGAT1*, At5g04140; *Fd-GOGAT2*, At2g41220) et les deux protéines associées sont localisées dans les chloroplastes. Fd-GOGAT1 est l'enzyme foliaire majoritaire et Fd-GOGAT2 se trouve plutôt dans les racines (Coshigano *et al.*, 1998). Des mutants EMS *gluS* (*CS30*, *CS103* et *CS113*) avec 5% d'activité glutamate synthase dans les feuilles par rapport au contrôle ont été identifiés avec un phénotype photorespiratoire, qui était absent en conditions de fort  $\text{CO}_2$  ( $10 \text{ mL.L}^{-1}$ ) (Somerville et Ogren, 1980a). Par la suite, la cartographie des mutations a révélé qu'elles se situaient dans le gène *Fd-GOGAT1* (Coshigano *et al.*, 1998). Ces mutants présentaient une assimilation nette de  $\text{CO}_2$  dans l'air 3 fois plus faible par rapport au contrôle, ainsi qu'une plus faible quantité de glutamate et une forte accumulation de glutamine et d'ammonium (Somerville et Ogren, 1980a). Ces données suggèrent que *Fd-GOGAT1* est le gène majoritairement impliqué dans la production de glutamate pour le cycle photorespiratoire, ainsi que dans la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire *via* le cycle GS-GOGAT. Un mutant ponctuel pour le gène *Fd-GOGAT1* (*glu1-201*; modification L1270F), avec une activité Fd-GOGAT normale mais une activité SHMT réduite, a été identifié. Il montre un phénotype photorespiratoire dans l'air, similaire à celui du mutant *shmt1-1* (Jamai *et al.*, 2009). Des expériences de colocalisation avec la GFP et de co-immunoprécipitation suggéraient un adressage mitochondrial de la protéine Fd-GOGAT1, où elle peut interagir avec la protéine SHMT1. Cette interaction semblerait être nécessaire pour l'activité de la SHMT mitochondriale d'après Jamai *et al* (2009). Un seul gène code une



NADH-GOGAT chez *A. thaliana* (*GLT1*, At5g53460) et il est très fortement exprimé dans les parties racinaires et les tissus vasculaires (Lancien *et al.*, 2002). Le mutant associé *glr1-t* ne montre pas de phénotype photorespiratoire dans l'air, mais sa croissance est réduite en fort CO<sub>2</sub> et les feuilles accumulent moins de glutamate. Cette enzyme jouerait un rôle important dans l'assimilation de l'azote dans les tissus non-photorespiratoires (Lancien *et al.*, 2002).

**La glutamine synthétase (EC 6.3.1.2 ; GS).** Elle catalyse l'assimilation de l'ammonium sur un glutamate pour former de la glutamine, avec de la consommation d'ATP. Chez *A. thaliana*, 6 gènes codent la GS (*GS1-1*, At5g37600 ; *GS1-2*, At1g66200 ; *GS1-3*, At3g17820 ; *GS1-4*, At5g16570 ; *GS1-5*, At1g48470; et *GS2*, At5g35630). Cependant, les protéines GS1 (1 à 5 ; sous-unités de 39-40 kDa) sont cytosoliques tandis que la protéine GS2 (sous-unité de 47 kDa) est chloroplastique, et peut-être aussi mitochondriale, chez *A. thaliana* (Taira *et al.*, 2004). Il a été montré chez *A. thaliana* que le gène *GS2* était au moins 10 fois plus exprimé par rapport aux gènes *GS1* dans les feuilles de rosettes, et que son expression était activée sous de fortes concentrations en azote (10 mM de nitrates) (Lothier *et al.*, 2011). Bien que des mutants pour le gène *GS2* chez *A. thaliana* n'aient pas été identifiés et caractérisés jusqu'à présent, des mutants pour le gène correspondant chez l'orge montrent un phénotype photorespiratoire après un transfert de fort CO<sub>2</sub> (8 mL.L<sup>-1</sup>) dans l'air (Kendall *et al.*, 1986). L'un des mutants pour la *GS2* (*RPr83/32*) présentait une inhibition de 40% de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> dans l'air, ainsi qu'une accumulation 50 fois plus élevée d'ammonium par rapport au contrôle (Wallsgrave *et al.*, 1987). De même, des mutants pour la *GS2* chez *Lotus japonicus* (*Ljpr1-3*) présentent un phénotype photorespiratoire après une semaine de transfert de fort CO<sub>2</sub> (7 mL.L<sup>-1</sup>) dans l'air. Ces mutants possèdent 30% d'activité GS dans les feuilles, et accumulent 50 fois plus d'ammonium par rapport au contrôle après 1 jour de transfert (Orea *et al.*, 2002). De plus, chez tous les mutants pour la *GS2*, l'expression des gènes *GS1* n'était pas affectée. Ces données démontrent que *GS2* est l'enzyme majoritairement impliquée dans l'assimilation de l'ammonium photorespiratoire. Les protéines codées par les gènes *GS1* seraient surtout présentes dans les tissus vasculaires, pour jouer peut être un rôle dans la remobilisation du glutamate, et plus particulièrement lors du remplissage du grain (Lothier *et al.*, 2010).

**La Catalase (EC 1.11.1.6 ; CAT).** Elle catalyse la conversion de deux molécules de peroxyde d'hydrogène en deux molécules d'H<sub>2</sub>O et une molécule d'O<sub>2</sub>. Chez *A. thaliana*, 3 gènes codent la CAT (*CAT1*, At1g20630 ; *CAT2*, At4g35090 ; *CAT3*, At1g20620). Les protéines

CAT1, CAT2 et CAT3 (sous-unités de 57 kDa) sont localisées dans le peroxyosome. Des mutants *cat2* présentant 10-15% d'activité catalase résiduelle dans les feuilles d'*Arabidopsis* ont été identifiés (Queval *et al.*, 2007). Ils montrent un retard de croissance dans l'air qui est absent en fort CO<sub>2</sub> (4,5 mL.L<sup>-1</sup>). Ceci suggère que l'enzyme CAT2 est majoritairement responsable de la prise en charge de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photorespiratoire produit par l'activité de la GOX. De façon intéressante, le phénotype des mutants *cat2* est aggravé avec l'augmentation de la photopériode (12h et 16h contre 8h), et ceci s'accompagne de l'apparition de nécroses au niveau des feuilles, et d'une augmentation du glutathion oxydé (Queval *et al.*, 2007). Des analyses transcriptomiques et des dosages d'acide salicylique ont montré que l'apparition de la mort cellulaire en jours longs chez ces mutants était due à une activation photopériode-dépendante des gènes de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique, provoquant son accumulation dans les feuilles (Mhamdi *et al.*, 2010). Ces données sont donc en faveur d'un rôle majeur pour le gène *CAT2* dans la régulation du stress oxydant chez *A. thaliana* et l'activation de la voie de l'acide salicylique par la signalisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**La Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (EC 4.1.1.39 ; RuBisCO).** Elle catalyse la fixation d'une molécule de CO<sub>2</sub> ou d'O<sub>2</sub> atmosphérique sur le RuBP pour former 2 molécules de 3-PGA (activité carboxylase) ou bien 1 molécule de 3-PGA et 1 molécule de 2-PG (activité oxygénase). Il existe 4 formes de RuBisCO (forme I : 8 petites sous-unités (RBCS) d'environ 15 kDa et 8 grandes sous-unités (RBCL) d'environ 53 kDa ; forme II : 2 RBCL ; les formes III et IV qui correspondent à la forme II avec un arrangement structural légèrement différent), mais seule la forme I est présente chez les plantes (Parry *et al.*, 2008). Il existe 4 gènes nucléaires codant la RBCS (*RBCS1A*, At1g67090 ; *RBCS1B*, At5g38430 ; *RBCS2B*, At5g38420 ; *RBCS3B*, At5g38410) et un seul gène chloroplastique codant la grande sous-unité (*RBCL*, AtCG00490) (Parry *et al.*, 2008). Cette enzyme est très abondante dans les feuilles et représente un quart de l'azote total foliaire. Son abondance permet de compenser son faible turnover catalytique (3 à 10 s<sup>-1</sup>) qui la rend peu efficace pour l'activité photosynthétique (Parry *et al.*, 2008). Les activités carboxylase et oxygénase de cette enzyme sont modulées par les quantités de CO<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> dans l'air au voisinage de cette enzyme (Servaites et Ogren, 1977). L'activité globale de la RuBisCO est dépendante de son état d'activation. Premièrement, la RuBisCO doit être activée par la fixation d'un CO<sub>2</sub> sur un résidu lysine du site catalytique (carbamylation), qui est lui-même stabilisé avec la fixation simultanée d'une molécule de Mg<sup>2+</sup>. Le site actif de l'enzyme est alors « ouvert », formant un complexe ternaire actif, et le résidu « activé » agira comme base pour transférer plusieurs

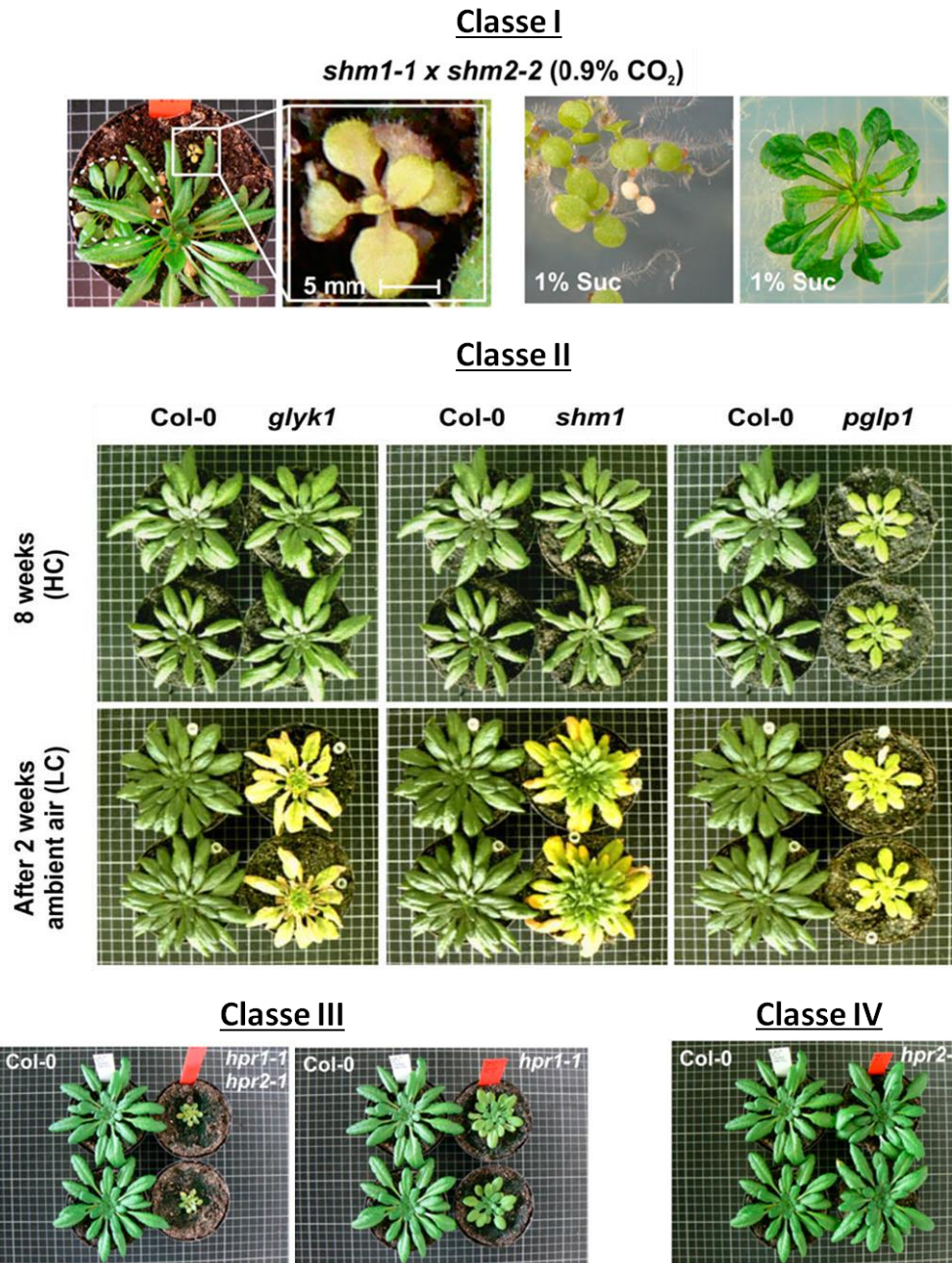


protons du RuBP lors de la réaction enzymatique (Cleland *et al.*, 1998). Par la suite, la fixation de CO<sub>2</sub> ou d'O<sub>2</sub> sur l'enzyme activée contenant le RuBP (énol-RuBP formé) conduira à la formation de 2-carboxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisphosphate ou 2-peroxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisphosphate, respectivement. Ces métabolites sont peu stables et en présence de protons et d'eau, ils se transforment en 3-PGA et 2-PG (Cleland *et al.*, 1998). Deuxièmement, des inhibiteurs de la RuBisCO peuvent se fixer avant, ou après la carbamylation et provoquer la « fermeture » du site catalytique, et ils doivent être enlevés. Ces inhibiteurs sont des sucres phosphates analogues d'un intermédiaire réactionnel (2-carboxy-D-arabinitol-1,5-biphosphate), ou bien de produits « ratés » lors de la réaction enzymatique (xylulose-1,5-biphosphate, par exemple). Ils peuvent être produits à la lumière, mais aussi présents à l'obscurité (Parry *et al.*, 2008). A cet effet, la plante possède une protéine, la RuBisCO activase, capable de retirer ces sucres phosphates du site actif de l'enzyme, en consommant de l'ATP (Spreitzer et Salvucci, 2002). Cette enzyme elle-même est régulée de façon positive par la thioredoxine f, activée par le transfert des électrons photosynthétique (Zhang et Portis, 1999) et à cet effet, l'activité de la RuBisCO est régulée positivement par l'intensité lumineuse.

### 3) Diversité des phénotypes des mutants photorespiratoires

Comme décrit précédemment, les mutants photorespiratoires ont la particularité de présenter un phénotype dans l'air, correspondant à différents symptômes (mortalité, retard de croissance, chlorose) qui sont absents pour la plupart des mutants lorsque la croissance s'effectue en conditions de fort CO<sub>2</sub>. Néanmoins, les symptômes varient d'un mutant à un autre (figure 6), probablement à cause de la redondance fonctionnelle de certains gènes (et donc d'isoformes), mais peut-être aussi à cause de leurs liens avec d'autres voies métaboliques (par exemple, l'assimilation de l'azote, le métabolisme C<sub>1</sub>, la signalisation par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les mutants pour des enzymes directement impliquées dans le recyclage du carbone photorespiratoire ont été classés en quatre classes majeures suivant la gravité des symptômes associés (Timm et Bauwe, 2013), dans lesquels nous avons rajouté les mutants pour des protéines « annexes » (transporteurs de dicarboxylates, cycle GS/GOGAT) lorsque cela était possible (Figure 6):

**Classe I (non-viables dans l'air et en conditions de fort CO<sub>2</sub>)**. C'est le cas des doubles mutants *gldp1-1xgldp2-2* et *shmt1-1xshmt2-2* qui ne sont pas viables dans l'air (arrêt de la



**Figure 6.** Exemples des quatre classes de phénotypes photorespiratoires (selon Timm et Bauwe, 2013). **Classe I** : le double mutant *shm1-1xshm2-2* en fort CO<sub>2</sub> sur terreau après 10 semaines de croissance (en haut) ou sur milieu MS + 1% sucrose (en bas, à gauche, après germination et à droite, après 8 semaines) (Engel *et al.*, 2011). **Classe II** : Le phénotype des mutants *glyk1*, *shm1* et *pglp1* après 8 semaines de croissance en fort CO<sub>2</sub> (10 mL.L<sup>-1</sup>), puis 2 semaines après leur transfert dans l'air (apparition de chlorose) (Timm *et al.*, 2012). **Classe III** : Le phénotype des mutants *hpr1* et *hpr1xhpr2* après 8 semaines de croissance dans l'air (Timm *et al.*, 2011). **Classe IV** : l'absence de phénotype du mutant *hpr2* après 8 semaines de croissance dans l'air (Timm *et al.*, 2011).

croissance au stade de 2 cotylédons pour *gldp1-1xgldp2-2* et pas de germination pour *shmt1-1xshmt2-2*). En conditions de fort CO<sub>2</sub> (9 mL.L<sup>-1</sup>), la croissance du mutant *gldp1-1xgldp2-2* sur un milieu MS avec 2% de sucrose s'arrête au stade 2 cotylédons et la plante meurt après 3-4 semaines (Engel *et al.*, 2007). Pour le mutant *shmt1-1xshmt2-2*, la croissance s'arrête rapidement dans l'air sur du terreau et la plante meurt après un mois. Sur un milieu MS avec 0,9% sucrose, ce mutant peut se développer pendant plusieurs mois mais ne produit pas de graines (Engel *et al.*, 2011). Le fait que ces mutants ne soient pas viables dans des conditions où la photorespiration est fortement réduite suggère un problème non lié à la photorespiration, et qui opère durant les premiers stades de développement. Les activités GDC et SHMT utilisent toutes les deux le cofacteur THF (sous forme méthylée ou non). Ce cofacteur est aussi utilisé par plusieurs enzymes qui jouent un rôle essentiel dans la biosynthèse de méthionine (voir Cossins, 2000), de S-adénosyl-méthionine (donneur universel de groupes méthyles pour la méthylation de l'ADN, d'hormones etc) (voir Roje, 2006), ainsi que la biosynthèse des purines (voir Zrenner *et al.*, 2006). Les phénotypes des mutants suggèrent que les enzymes SHMT et GDC jouent un rôle indispensable au développement des plantes, possiblement *via* des interactions avec le métabolisme C<sub>1</sub> (qui seront développées dans le chapitre « les interactions de la photorespiration avec le métabolisme primaire des feuilles »).

**Classe II (non viables dans l'air ou bien un très fort retard de croissance, mais viables en conditions de fort CO<sub>2</sub> avec l'apparition de chlorose et un retard de croissance après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air).** C'est le cas des mutants *shm1* (Engel *et al.*, 2011), *glyk1* (Boldt *et al.*, 2005), *pglp1* (Scharwtze et Bauwe, 2007), *gluS* (Somerville et Ogren, 1980a), *sagt1* (Somerville et Ogren, 1980b), *dct1* (Tanaguchi *et al.*, 2002), *hpr1xhpr2* et *hpr1xhpr2xhpr3* (Timm *et al.*, 2011) qui présentent un très fort retard de croissance dans l'air, et du mutant *pglp1* (Scharwtze et Bauwe, 2007) qui n'est pas viable dans l'air. Le mutant *plgg1* (Pick *et al.*, 2013) présente de forts symptômes de chlorose après un transfert de fort CO<sub>2</sub> à l'air ambiant, tout comme les mutants *shm1*, *glyk1*, *pglp1* (Timm *et al.*, 2012), et *dct1* (Tanaguchi *et al.*, 2002) (figure 6). L'absence de symptômes photorespiratoires pour ces mutants dans des conditions de fort CO<sub>2</sub> peut nécessiter dans certains cas de très fortes concentrations en CO<sub>2</sub> (de 1,5 mL.L<sup>-1</sup> jusqu'à 20 mL.L<sup>-1</sup> pour *pglp1*) ainsi que la présence de sucrose dans le milieu (jusqu'à 2%) lorsque les plantes sont cultivées *in vitro*. Les symptômes de ces mutants sont essentiellement attribués à la baisse de leur activité photorespiratoire et ils présentent une très forte inhibition de leur activité photosynthétique à la lumière et/ou une très forte accumulation des substrats des enzymes mutées (Somerville et Ogren, 1980a ;

Somerville et Ogren, 1980b ; Tanaguchi *et al.*, 2002 ; Boldt *et al.*, 2005 ; Takahashi *et al.*, 2007 ; Scharwtze et Bauwe, 2007 ; Timm *et al.*, 2011 ; Engel *et al.*, 2011 ; Pick *et al.*, 2013).

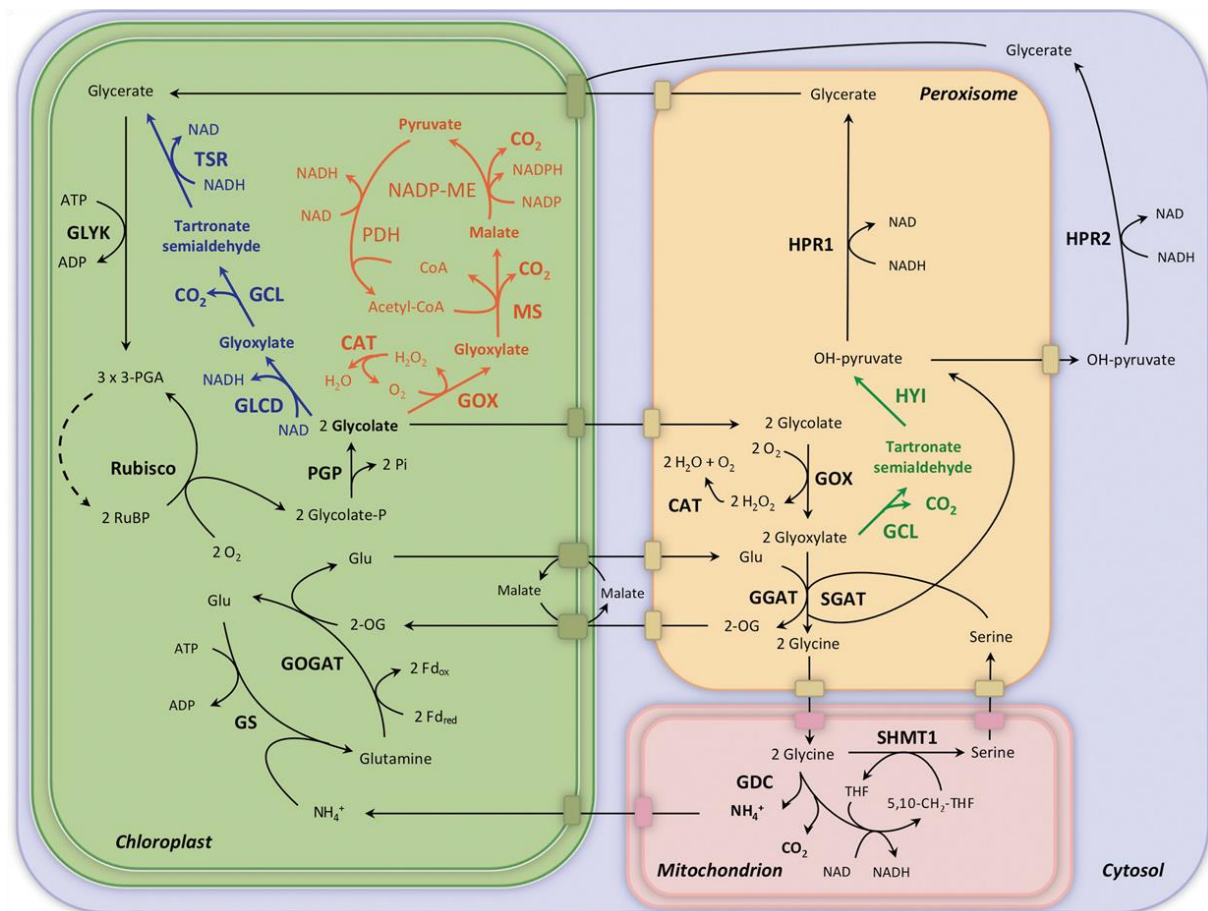
**Classe III (viabiles dans l'air avec croissance ralentie et pas de symptôme en conditions de fort CO<sub>2</sub>).** C'est le cas des mutants *gga1* (Igarashi *et al.*, 2003), *hpr1* (Timm *et al.*, 2011), et *cat2* (Queval *et al.*, 2007). Ils montrent une faible altération de leur activité photosynthétique et/ou une faible altération de leur métabolisme primaire dans l'air. Il faut noter que le phénotype de classe III de *hpr1* dépend de la longueur de la photopériode (Timm *et al.*, 2008 et 2011).

**Classe IV (pas de symptôme dans l'air).** C'est le cas des mutants *gox1*, *gox2* (Rojas *et al.*, 2012 ; mes travaux de thèse), *gdlp1*, *gdlp2* (Engel *et al.*, 2007), *hpr2* et *hpr3* (Timm *et al.*, 2011). L'absence de symptôme dans l'air pour ces mutants est essentiellement due à la redondance fonctionnelle des gènes *GOX*, *HPR* et *GDLP* codant différentes isoformes.

#### 4) Intérêts agronomiques liés à la photorespiration

Dans un contexte d'augmentation de la population mondiale et de changement climatique, il est devenu urgent d'obtenir des plantes avec un fort rendement, une meilleure résistance aux stress et/ou utilisant peu d'intrants. Le cycle photorespiratoire étant associé à des pertes de carbone et d'ammonium (au niveau du complexe GDC), ainsi que d'énergie (consommation d'ATP par la glycérate kinase), il est devenu une cible privilégiée pour l'amélioration des plantes (Maurino et Weber, 2013). Dans ce contexte, la suppression ou la réduction du cycle photorespiratoire chez les plantes d'intérêt agronomique pourrait permettre d'augmenter la fixation de carbone tout en limitant les pertes en carbone, en azote et en énergie, conduisant donc à l'augmentation de leur biomasse. Plusieurs cibles peuvent être utilisées pour réduire la photorespiration, par exemple l'augmentation de la fixation de CO<sub>2</sub> et/ou une diminution de la fixation d'O<sub>2</sub>, par la RuBisCO. Cependant, le facteur de spécificité de la RuBisCO (ratio entre les  $V_{\max}$  et  $K_m$  pour l'O<sub>2</sub> et le CO<sub>2</sub>) n'est pas modifiable par mutagenèse, et les tentatives de mutagenèse sur la grande sous-unité de la RuBisCO pour augmenter l'activité catalytique, par transformation de chloroplastes, ne sont pas encore assez développées pour l'application à des plantes d'intérêt agronomique (Parry *et al.*, 2013). Une autre possibilité serait le remplacement de sous-unités de la RuBisCO de plantes d'intérêt agronomique par celles venant d'autres espèces avec des propriétés plus avantageuses. Mais les résultats ne sont pas





**Figure 7. Différentes voies alternatives déjà réalisées chez des plantes afin de réduire les pertes photorespiratoires.** En bleu, la voie du glycérate de la bactérie *E. coli* ; En vert, la voie de l'oxydation du glycolate ; En rouge, la voie du catabolisme du glyoxylate. RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; PGP, 2-phosphoglycolate phosphatase; GOX, glycolate oxydase; CAT, catalase; GGAT, glutamate:glyoxylate aminotransférase; GDC, complexe glycine décarboxylase; SHMT, sérine hydroxyméthyl transférase; SGAT, sérine:glyoxylate aminotransférase; HPR, hydroxypyruvate réductase; GLYK, glycérate kinase; GS, glutamine synthétase; GOGAT, glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase; GLCD, glycolate déshydrogénase; GCL, glyoxylate carboligase; HYI, hydroxypyruvate isomerase; TSR, tartronate semialdehyde réductase; MS, malate synthase; NADP-ME, enzyme malique à NADP; PDH, pyruvate déshydrogénase ; RuBP, ribulose-1,5-bisphosphate; THF, tétrahydrofolate; 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, 5,10-méthylène-THF (Maurino et Weber, 2013).

encourageants (voir Singh *et al.*, 2014). Les cyanobactéries possèdent des carboxysomes, complexes de plusieurs protéines dont la RuBisCO et l'anhydrase carbonique, qui permettent de fortement concentrer le CO<sub>2</sub> au voisinage de la RuBisCO. Récemment, l'introduction des protéines du carboxysome de *Synechococcus* chez le tabac a été réalisée, mais les plantes présentent un fort retard de croissance (Lin *et al.*, 2014). Aussi, l'inhibition de la photorespiration à travers des mutants d'enzymes de la photorespiration pourrait être envisagée mais la présence d'un phénotype photorespiratoire confirme qu'elle est essentielle à la croissance des plantes (Timm et Bauwe, 2013). Une autre possibilité serait d'introduire une voie alternative à la photorespiration, qui agirait en parallèle et limiterait les pertes de CO<sub>2</sub> et d'ammonium, ou bien qui aurait un coût énergétique moins élevé. Plusieurs voies alternatives ont déjà été décrites chez *A. thaliana*, *N. tabacum* et *S. tuberosum*.

- Cinq gènes codant trois enzymes bactériennes (glycolate déshydrogénase (*GLCD*), glyoxylate carboligase (*GCL*) et tartronate semialdehyde reductase (*TSR*)) de la voie du catabolisme du glycolate d'*E. coli* avec un adressage spécifique aux chloroplastes ont été exprimés chez *A. thaliana* (Figure 7, en bleu) (Kebeish *et al.*, 2007). Cette voie alternative permet de métaboliser le glycolate en glycérate en trois étapes, sans consommation d'énergie ni production d'ammonium, et un bilan nul pour l'utilisation du pouvoir réducteur (NADH). De plus, l'étape de décarboxylation a lieu directement dans le chloroplaste, permettant d'augmenter sa refixation par la RuBisCO. De façon remarquable, ces plantes ont 30% de diamètre de rosette en plus dans l'air et 50% de masse sèche en plus dans les feuilles et les racines. Des expériences de marquages au <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> et de mesure du « Post-Illumination Burst » ont montré que l'étape de décarboxylation de la GDC était réduite de moitié chez ces plantes (Kebeish *et al.*, 2007). Aussi ces lignées montrent une augmentation de 50% de leur assimilation nette de CO<sub>2</sub> par rapport au contrôle. Il faut noter que des changements significatifs sont déjà observables avec les plantes ne surexprimant que les 3 sous-unités de la GLCD. Mais ces lignées ne sont pas très stables d'une génération à l'autre (Kebeish *et al.*, 2007).
- Deux gènes codant deux enzymes bactériennes de la voie du catabolisme du glyoxylate de *E. coli* (Glyoxylate carboligase (*GCL*) et Hydroxypyruvate isomérase (*HYI*)) avec un adressage peroxysomal, ont été surexprimés de façon transitoire chez *N. tabacum* (Carvalho *et al.*, 2011). Cette voie alternative permet de métaboliser le glyoxylate en hydroxypyruvate avec la production de CO<sub>2</sub> uniquement, limitant ainsi les

pertes d'ammonium (Figure 7, en vert). Cependant les plantes transformées exprimant les gènes codant pour la *GCL*, ou bien pour la *GCL* et la *HYI*, présentent des lésions nécrotiques au niveau des feuilles après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, associées à une accumulation de glycine et de sérine. Des expériences avec du <sup>14</sup>C-glycolate ont montré que la glycine et la sérine étaient légèrement moins marquées dans les plantes transformées, suggérant une très faible activité de la voie alternative. La présence de la protéine GCL a pu être détectée dans les feuilles, mais pas celle de HYI. Ceci impliquerait que la majeure partie du glyoxylate serait décarboxylé dans le peroxysome sans être pris en charge par la suite, conduisant à des pertes en carbone encore plus importantes dans l'air (Carvalho *et al.*, 2011).

- Deux gènes codant deux enzymes végétales (*GOX* et Malate Synthase (*MS*)) avec un adressage chloroplastique ont été surexprimés chez *A. thaliana* (Fahnenstich *et al.*, 2008) (Figure 7, en rouge). Cette voie alternative utilise aussi la NADP-ME et la pyruvate déshydrogénase (*PDH*) déjà présentes dans le chloroplaste. Elle permet de convertir le glycolate en acétyl-CoA, avec la production de pouvoir réducteur (NADH et NADPH), une double décarboxylation au voisinage de la RuBisCO (qui peut augmenter sa réassimilation), et pas de perte d'ammonium. Cependant, les plantes transformées (*GOX-MS*) présentaient un fort retard de croissance dans l'air, absent en conditions de fort CO<sub>2</sub>. Comme la *GOX* produit de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le chloroplaste par cette voie alternative, le gène codant la catalase a été rajouté avec un adressage chloroplastique afin de métaboliser l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit (Figure 7, en rouge) (Maier *et al.*, 2012). Les plantes transformées résultantes (*GMK3*) ont 20% de feuilles de rosette en plus, avec une masse fraîche et sèche de la partie aérienne 30% plus importante que le contrôle dans l'air. De même, elles accumulent plus d'amidon dans les feuilles par rapport au contrôle. Mais les feuilles des mutants sont moins épaisses, avec une quantité de pigments chlorophylliens par surface diminuée et une assimilation nette de CO<sub>2</sub> inchangée par rapport au contrôle (Maier *et al.*, 2012).
- Les gènes codant les trois sous-unités de l'enzyme glycolate déshydrogénase (*GLCD* ; D, E et F) d'*E. coli* avec un adressage chloroplastique (comme dans Kebeish *et al.*, 2007 chez *A. thaliana*) ont été introduit chez *S. tuberosum* (Nölke *et al.*, 2014). Cette construction permet l'expression simultanée des trois sous-unités de la *GLCD*, afin de produire une polyprotéine. De plus, cette enzyme peut dégrader directement le glycolate en glyoxylate

dans les chloroplastes sans produire d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (comparé à la voie photorespiratoire qui utilise la GOX). Étonnamment, les plantes transformées sont plus grandes, avec plus de feuilles, 25% de photosynthèse en plus, et une intensité photorespiratoire réduite par rapport au contrôle. Les plantes accumulent plus de glucose, fructose, sucrose, et d'amidon dans les feuilles par rapport au contrôle. De plus, la masse des tubercules est doublé (2,3 fois plus de masse) chez ces plantes.

Cette dernière voie alternative offre des résultats prometteurs par rapport aux autres (augmentation du rendement d'une plante d'intérêt agronomique).

Récemment, la surexpression des sous-unités H ou L du complexe GDC a été réalisée chez *A. thaliana*, et les résultats, quoi que surprenants, offrent des perspectives pour l'amélioration des plantes *via* l'augmentation de l'activité du cycle photorespiratoire.

- La séquence codante la protéine H du complexe GDC de *Flaveria pringlei* a été introduite chez *A. thaliana* (Timm *et al.*, 2013b). Deux lignées (FpH L17 et FpH L18) surexprimant ce gène montrent une plus grande croissance dans l'air par rapport au contrôle, avec environ 20% en plus de diamètre de rosette, de nombres de feuilles par plante, de masse fraîche et de masse sèche. Ces plantes font 15% de photosynthèse en plus que le contrôle, avec un taux de transfert d'électrons photosynthétique 30% plus important sous forte lumière (350 à 900  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Aussi, la quantité relative de plusieurs métabolites du cycle de Calvin (RuBP, R5P, Ru5P+X5P), de la photorespiration (glycolate, glycine, glycérate) ainsi que le ratio glycine/sérine sont réduits chez les lignées FpH L17 et FpH L18 par rapport au contrôle. Il a été proposé que la surexpression de la protéine H du complexe GDC favorisait l'activité du cycle photorespiratoire, provoquant une baisse de certains intermédiaires photorespiratoires (glyoxylate et glycine) (Timm *et al.*, 2013b). Ces intermédiaires exerçant un rétrocontrôle négatif sur l'activité photosynthétique, il y aurait ainsi une levée de répression sur la photosynthèse, d'où l'augmentation de la fixation de  $\text{CO}_2$  observée dans les lignées FpH L17 et FpH L18 (Timm *et al.*, 2013).
- La séquence codante la protéine L du complexe GDC de *Pisum sativum* (*mtLPD*) a été introduite chez *A. thaliana* afin d'y être surexprimée de façon constitutive (Timm *et al.*, 2015). Trois lignées résultantes (PsL-L1, PsL-L2 et PsL-L3) montrent une plus forte



croissance par rapport au contrôle dans l'air, associée à une augmentation de 15% de la fixation nette de CO<sub>2</sub> et de l'activité photorespiratoire (décarboxylation par le complexe GDC), mais uniquement en jours courts (pas de différences observables à partir de 12h de photopériode). Le taux de transfert d'électrons photosynthétique chez ces plantes est plus important, même sous faible intensité lumineuse, et l'état d'activation de la RuBisCO est légèrement augmenté par rapport au contrôle. Aussi, le ratio glycine/sérine est réduit de moitié chez ces lignées. De la même façon que précédemment, il a été proposé que l'augmentation de l'activité photorespiratoire abaissait la quantité de certains métabolites photorespiratoires « toxiques » pour la RuBisCO et/ou le cycle de Calvin-Benson, permettant d'obtenir une plus grande activité photosynthétique chez les lignées PsL-L1, PsL-L2 et PsL-L3 (Timm *et al.*, 2015).

### **III. Les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire dans les feuilles de plantes**

La photorespiration peut interagir avec plusieurs grandes voies du métabolisme primaire des plantes au cours de son cycle. Tout d'abord, avec la photosynthèse *via* le partage de la RuBisCO par les deux voies, mais aussi *via* le recyclage du carbone du 2-PG pour produire du 3-PGA, qui pourrait être utilisé par le cycle de Calvin-Benson pour la régénération du RuBP. Par ailleurs, ce 3-PGA peut aussi alimenter la glycolyse, et donc le cycle de Krebs, la biosynthèse de saccharose et d'autres métabolites comme la sérine. Puis, les déshydrogénases du cycle de Krebs pourraient rentrer en compétition avec la GDC pour l'utilisation du NAD<sup>+</sup> dans les mitochondries. La photorespiration est aussi étroitement liée au métabolisme C<sub>1</sub> (indispensable pour les réactions de méthylations chez la plante) car ils utilisent tous les deux le THF. La photorespiration pourrait interagir avec l'assimilation de l'azote *via* l'utilisation du glutamate par la GGT et la refixation d'ammonium photorespiratoire par la GS2, qui a besoin aussi de glutamate pour former de la glutamine. Enfin, elle peut interagir avec d'autres voies de biosynthèse des acides aminés par la production de glycine et de sérine. Ces différentes interactions vont être détaillées dans la section qui suit.

## 1) Interactions avec la photosynthèse

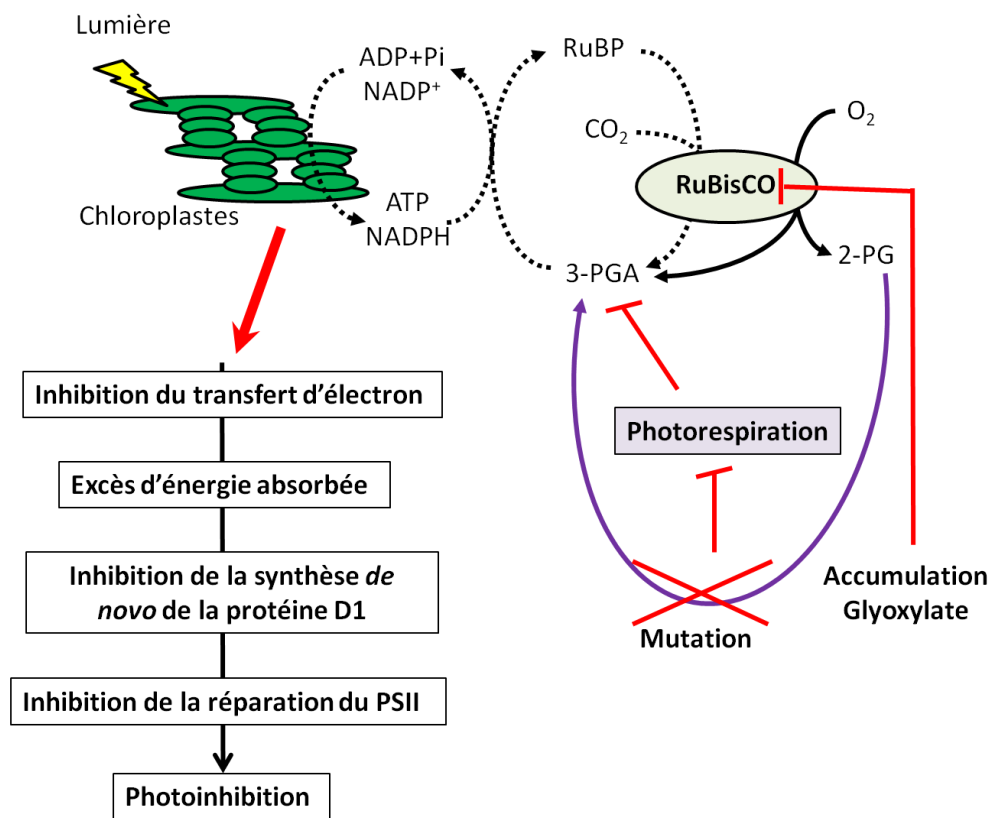
La photorespiration et la photosynthèse sont liées *via* le partage de la RuBisCO, mais aussi *via* la régénération du RuBP. En effet, le recyclage photorespiratoire des carbones du 2-PG va produire du 3-PGA qui peut être utilisé par le cycle de Calvin-Benson pour régénérer du RuBP. Les premiers mutants photorespiratoires pour les enzymes PGLP, SHMT, SGAT et GDC chez *A. thaliana* identifiés par Somerville et Ogren présentaient un retard de croissance, associé à une inhibition de plus de 60% de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> dans l'air. De façon remarquable, chez ces mutants, cette inhibition était fonction de la concentration en oxygène dans l'air (inhibition résiduelle dans 2% O<sub>2</sub>, plus forte inhibition dans 50% O<sub>2</sub>) (Somerville et Ogren, 1979, 1980, 1981, 1982). D'autres mutants pour les enzymes Fd-GOGAT, PGLP, GLYK et le transporteur DiT, présentaient eux-aussi jusqu'à 60% d'inhibition de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> après une heure ou un jour de transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air (Timm *et al.*, 2012 ; Takahashi *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données montre que la fixation nette de CO<sub>2</sub> est réduite chez les mutants photorespiratoires, et par conséquent l'activité carboxylase de la RuBisCO. Cette activité peut être réduite *in vivo* par une diminution de l'état d'activation de la RuBisCO, une diminution de la quantité de RuBisCO, une diminution de la quantité de CO<sub>2</sub> (*via* l'ouverture stomatique) et/ou une diminution de la quantité de RuBP (défaut de production ou de recyclage). Chez les mutants photorespiratoires d'*A. thaliana* pour les enzymes SHMT, Fd-GOGAT et le complexe GDC, la quantité de RuBP dans les feuilles est fortement diminuée après 30 min de lumière dans un air à 50% O<sub>2</sub> (Chastain et Ogren, 1989). Chez le riz, des lignées antisens pour la GOX qui montrent une croissance et une assimilation nette de CO<sub>2</sub> plus faible dans l'air, ont un rendement quantique du PSII diminué dès 40% d'activité GOX restante dans les feuilles. Ces plantes expriment moins le gène codant la RuBisCO activase, et ont une diminution de l'état d'activation de la RuBisCO (Xu *et al.*, 2009). Ceci suggère que l'inhibition de la photosynthèse par la photorespiration pourrait être multiple et liée au recyclage du carbone pour produire du RuBP par le cycle de Calvin-Benson, mais aussi à l'état d'activation de la RuBisCO. Une hypothèse avancée dans la littérature pour expliquer cette inhibition photosynthétique par la photorespiration serait l'effet toxique de certains intermédiaires du cycle photorespiratoire sur la RuBisCO et/ou d'autres enzymes faisant parties du cycle de Calvin-Benson. En effet, il a déjà été montré *in vitro* que le 2-PG inhibe la triose phosphate isomérase purifiée à partir de feuilles chez *P. sativum* (enzyme du cycle de Calvin-Benson essentielle à la régénération du

RuBP) (Anderson, 1971). Aussi, le glyoxylate peut inhiber :

- L'activité *in vitro* de la RuBisCO purifiée à partir de feuilles d'épinard (Cook *et al.*, 1985), ou dans les chloroplastes d'épinard (Campbell et Ogren, 1990) et des feuilles d'*A. thaliana* (Chastain et Ogren, 1989).
- L'activation de la RuBisCO à la lumière (Mulligan *et al.*, 1983; Chastain et Ogren, 1989) ou par la RuBisCO activase d'épinard (Campbell et Ogren, 1990) dans les chloroplastes d'épinard.

Récemment, une corrélation a été observée entre l'inhibition de la photosynthèse et l'accumulation du glyoxylate dans les feuilles de lignées transgéniques pouvant éteindre l'expression du gène *OsGLO4* (codant une GOX) chez le riz (Lu *et al.*, 2013). Donc l'accumulation de 2-PG et/ou de glyoxylate suite à l'interruption du cycle photorespiratoire pourrait conduire à l'inhibition de l'activité carboxylase de la RuBisCO (Figure 8). Chez *A. thaliana*, des plantes surexprimant les protéines H ou L du complexe GDC montraient une plus grande assimilation nette de CO<sub>2</sub>, avec une activité photorespiratoire plus intense et une diminution de la quantité de glycolate, de glycérate et du ratio glycine/sérine (Timm *et al.*, 2013b ; Timm *et al.*, 2015). L'état d'activation de la RuBisCO chez les lignées surexprimant la protéine L était plus élevée que le contrôle. Ici, c'est la diminution du glycolate et le changement du ratio glycine/sérine qui pourrait promouvoir l'état d'activation de la RuBisCO. Cependant, des lignées antisens pour la GOX chez le riz qui montrent une inhibition de l'activité RuBisCO accumulent beaucoup de glycolate, mais pas de glyoxylate (Xu *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le phénomène d'inhibition photosynthétique par la photorespiration pourrait perdurer à cause de l'accumulation de produits de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique. Suite à une diminution de la photorespiration, le ralentissement du recyclage du carbone pour le RuBP ainsi que la diminution de l'état d'activation de la RuBisCO devraient impacter sur l'activité du cycle de Calvin-Benson, et conduire à l'accumulation transitoire de NADPH et d'ATP dans les chloroplastes. Cela provoquerait alors le ralentissement du transfert d'électrons photosynthétique qui pourrait s'accompagner de la production de ROS, composés pouvant endommager le PSII (Nath *et al.*, 2013). Suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, des mutants pour les protéines Fd-GOGAT, DiT, SHMT et GLYK présentaient une rapide et forte augmentation du « non-photochemical quenching »



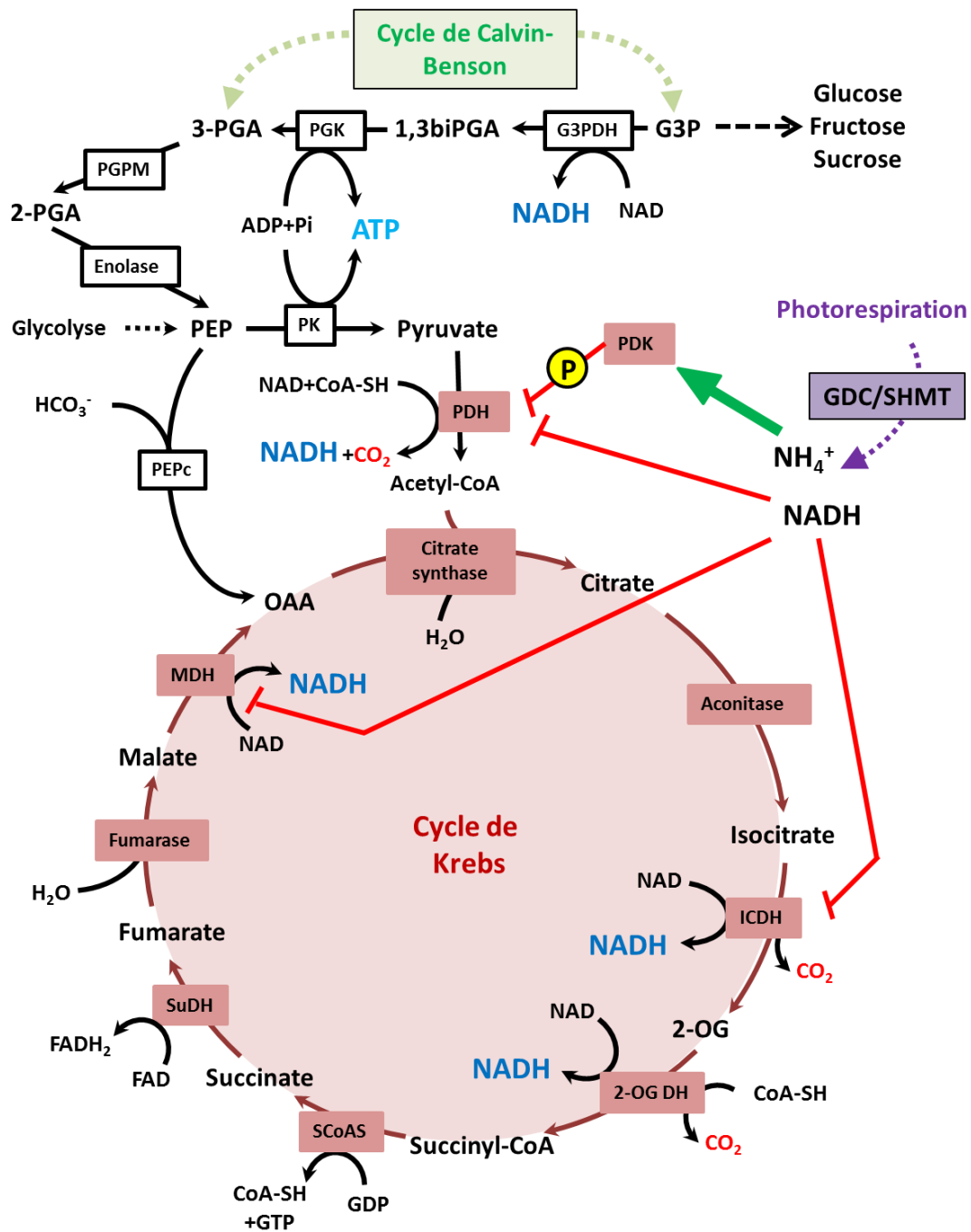
**Figure 8.** Schéma simplifié des interactions possibles entre la photosynthèse et la photorespiration chez un mutant photorespiratoire. L'interruption du recyclage photorespiratoire du carbone inhibe le recyclage du RuBP par le cycle de Calvin-Benson, conduisant à la photoinhibition. L'accumulation du glyoxylate pourrait aussi inhiber l'activité et/ou l'état d'activation de la RuBisCO. L'accumulation d'ATP et de pouvoir réducteur inhiberait le transfert d'électrons photosynthétique, conduisant à une dissipation de l'excès d'énergie absorbée par les photosystèmes sous forme de chaleur, ainsi que des fuites d'électrons au niveau de la chaîne. La production de ROS engendrée par ces fuites dégraderait la protéine D1. Or la synthèse *de novo* de cette protéine est inhibée chez les mutants photorespiratoires, conduisant alors à la dégradation irréversible des PSII, et l'apparition de la photoinhibition (adapté de Takahashi *et al.*, 2007).

(NPQ), en plus d'une inhibition de la fixation de  $\text{CO}_2$  (Takahashi *et al.*, 2007). Le NPQ correspond à la réduction de la fluorescence chlorophyllienne émise par le LHCII/PSII qui n'est pas due à la photochimie. Cette réduction est associée à trois processus : la dissipation par chaleur, le changement d'état de transition des photosystèmes (State1-State2), et la photoinhibition (dégradation de protéines associées aux photosystèmes) (Horton *et al.*, 1996 ; Maxwell et Johnson, 2000). Le rapport  $F_v/F_m$  (efficacité maximale photochimique du PSII) était fortement diminué dans l'air chez ces mutants, et dépendant du transfert d'électrons photosynthétique, qui diminuait lui aussi. Il a été démontré que la protéine D1 du centre réactionnel des PSII était dégradée chez les mutants et les plantes sauvages, mais que la synthèse *de novo* de cette protéine était uniquement inhibée chez ces mutants dans l'air. Ceci implique que l'augmentation du NPQ est la conséquence d'une photoinhibition (Takahashi *et al.*, 2007). Les auteurs ont proposé que la production de ROS chloroplastique par le ralentissement du transfert d'électrons (via inhibition photorespiratoire de l'activité du cycle de Calvin-Benson) était la cause de cette dégradation (Figure 8; Takahashi *et al.*, 2007).

## 2) Interactions avec le cycle de Krebs

A la lumière, la fixation de  $\text{CO}_2$  par la RuBisCO ainsi que le cycle photorespiratoire permettent la production de 3-PGA, qui après réduction par des enzymes du cycle de Calvin-Benson deviendra du G3P. Les trioses-phosphates peuvent être utilisés pour la production de saccharose dans le cytosol, ou la production d'amidon dans les chloroplastes (voir Ruan, 2014). Ils peuvent aussi alimenter la glycolyse (voie de dégradation des sucres en pyruvate) afin de produire du pyruvate dans le cytosol (Figure 9). Le pyruvate est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale pour y être décarboxylé par la PDH, et produire de l'acétylCoA et du NADH, à partir de NAD et de CoA-SH. L'acétylCoA peut être utilisé par le cycle de Krebs et permettre la production de pouvoir réducteur sous forme de NADH ou  $\text{FADH}_2$  par diverses déshydrogénases (isocitrate déshydrogénase (ICDH), 2-oxoglutarate déshydrogénase (2-OGDH), malate déshydrogénase (MDH) dans la matrice mitochondriale et la succinate déshydrogénase (SuDH) qui est associée à la membrane). Au cours de ce cycle, du  $\text{CO}_2$  sera produit par les enzymes PDH, ICDH, et 2-OGDH (Figure 9).

Le pouvoir réducteur produit par le cycle de Krebs peut être utilisé par les complexes I (NADH déshydrogénase) et II (SuDH) de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale. La réoxydation des molécules de NADH et de  $\text{FADH}_2$  va alors produire des protons, et initier



**Figure 9.** Schéma simplifié des interactions entre le cycle de Krebs et le cycle de Calvin-Benson, ainsi que la régulation de son activité par l'activité photorespiratoire mitochondriale. Encadrés blancs, enzymes cytosoliques uniquement. G3PDH, glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; PGK, 3-phosphoglycérate kinase ; PGPM, phosphoglycérate phosphomutase ; PK, pyruvate kinase ; PEP, phoshoenolpyruvate ; PEPc, PEP carboxylase ; PDH, pyruvate déshydrogénase ; PDK, PDH kinase ; ICDH, isocitrate déshydrogénase ; 2-OGDH, 2-oxoglutarate déshydrogénase ; SCoAS, succinylCoA synthase ; SuDH, succinate déshydrogénase ; MDH, malate déshydrogénase ; GDC/SHMT, glycine décarboxylase/sérine hydroxyméthyl aminotransférase.

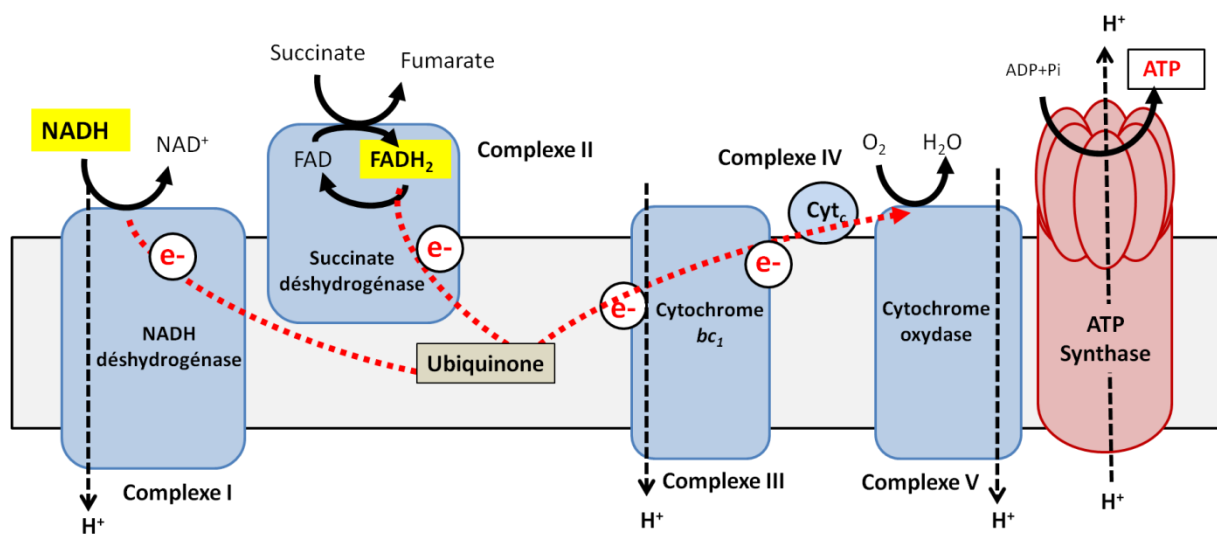
un transfert d'électrons vers l'ubiquinone, puis vers les complexes III, IV et V (Schertl et Braun, 2014). Ce dernier complexe constitue l'accepteur final de la chaîne d'électrons, permettant l'oxydation de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O (consommation d'oxygène). Au cours de ces réactions, des protons passent au travers de la membrane interne des mitochondries *via* les complexes I, II et V, générant un gradient de protons qui sera utilisé par l'ATP synthase, produisant de l'ATP dans la matrice mitochondriale (Figure 10).

Ainsi, une des fonctions majeures du cycle de Krebs est la production de pouvoir réducteur afin d'alimenter la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale pour la production d'ATP. Ce cycle permet aussi de fournir les squelettes carbonés nécessaires à la biosynthèse d'acides aminés, *via* la synthèse de 2-OG. En effet, ce dernier est nécessaire à la production du glutamate par la Fd-GOGAT, qui est ensuite utilisé pour l'assimilation de l'azote inorganique dans les chloroplastes *via* l'activité de la GS2 (Lancien *et al.*, 1999 ; Hodges, 2002 ; Araujo *et al.*, 2008 ; Foyer *et al.*, 2011).

L'activité du cycle de Krebs a été étudiée plus en détail chez plusieurs espèces. Chez l'épinard, des mesures de l'intensité de la respiration mitochondriale en réponse à différents substrats du cycle de Krebs ont été réalisées sur des mitochondries purifiées à partir de feuilles. Puis diverses activités de ce cycle, ainsi que la quantité des métabolites exportés ont été dosées sur ces mêmes extraits (Hanning et Heldt, 1993). Les données suggéraient que le citrate était exporté hors des mitochondries pour servir à la synthèse de glutamate *via* le 2-OG, tandis que l'oxaloacétate, produit par la PEPc, était converti en malate, qui était retransformé en oxaloacétate pour servir à la production de citrate. Par contre, le succinate et le fumarate étaient très peu utilisés pour la production de malate (Hanning et Heldt, 1993). Chez *Xanthium strumarium*, des expériences de marquages au <sup>13</sup>C avec du glucose ou du pyruvate solubilisé dans de l'eau simple ou lourde ont été réalisées sur des feuilles (Tcherkez *et al.*, 2009). Les résultats démontraient que :

- Les décarboxylations associées au cycle de Krebs étaient réduites à la lumière par rapport à l'obscurité.
- A la lumière, le fumarate était produit *via* l'oxaloacétate et le malate, tandis que le 2-OG était produit à partir d'un stock de citrate vacuolaire non-marqué pour la synthèse de glutamate, nécessaire à l'assimilation d'azote.

Chez *Brassica napus*, des expériences de marquages au <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> ont montré que le glutamate était plus marqué après un cycle jour/nuit par rapport à un marquage direct pendant la journée.



**Figure 10.** Schéma simplifié de la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale. Cyt, cytochrome ; FAD, Flavine adénine dinucléotide. Le trait pointillé rouge représente le flux d'électrons (Adapté de Schertl et Braun, 2014).



Les auteurs ont proposé que le citrate produit durant le jour était stocké pendant la nuit, pour être réutilisé le lendemain par le cycle de Krebs (Gauthier *et al.*, 2010).

L'activité de plusieurs enzymes du cycle de Krebs peut être régulée par la quantité de NADH et de  $\text{NH}_4^+$  dans les mitochondries. En effet, il a été montré que l'activité de la PDH mitochondriale purifiée à partir de feuilles de maïs et de pois était inhibée par de faibles concentrations en NADH ( $K_i = 20 \mu\text{M}$ ) (Thelen *et al.*, 1998). L'activité de l'ICDH à NAD purifiée à partir de feuilles de pois est aussi inhibée par le NADH ( $K_i = 180 \mu\text{M}$ ) (Igamberdiev et Gaderström, 2003). Ces données suggèrent une inhibition de l'activité de l'ICDH et de la PDH *via* l'augmentation des concentrations en NADH dans les mitochondries (Figure 9). Aussi, il a été démontré dans des mitochondries purifiées de jeunes plantules de pois que l'activité de la PDH kinase (PDK) était stimulée en présence de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (dès  $100 \mu\text{M}$ ) (Schuller et Randall, 1988). Chez les plantes, la PDK d'*A. thaliana* peut phosphoryler et inhiber le complexe PDH du maïs *in vitro* (Thelen *et al.*, 2000). Ceci implique que l'accumulation de  $\text{NH}_4^+$  dans les mitochondries pourrait aussi inhiber l'activité de la PDH, *via* la PDK, par phosphorylation (figure 9). Donc, l'activité photorespiratoire du complexe GDC qui libère une forte quantité de NADH et de  $\text{NH}_4^+$  dans les mitochondries pourrait inhiber l'activité des enzymes PDH et ICDH (et potentiellement l'activité de toutes les déshydrogénases à NAD dans la mitochondrie) et stimuler l'activité de la PDK. En effet, sous des conditions de faibles concentrations en  $\text{CO}_2$  (forte photorespiration) et de lumière saturante, le NADH s'accumule dans les mitochondries de protoplastes de pois (jusqu'à  $500 \mu\text{M}$ ) (Igamberdiev et Gaderström, 2003) et cela serait largement suffisant pour inhiber la PDH chez cette plante ( $K_i = 20 \mu\text{M}$  pour le NADH).

Cependant, dans la littérature, deux exemples d'expériences réalisées *in vivo* sont contradictoires. Des expériences de marquages du métabolisme primaire avec du  $^{13}\text{C}$ 1-pyruvate sur des feuilles de *Xanthium strumarium* réalisées dans des conditions où la photorespiration est plus importante ( $140$  et  $400 \mu\text{L.L}^{-1}$  contre  $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$   $\text{CO}_2$  dans l'air) montrent une forte augmentation du taux de décarboxylations liés à la respiration (activités PDH, ICDH, et 2-OGDH), ainsi qu'une plus forte accumulation du marquage dans des composés intermédiaires de ce cycle (succinate et fumarate) (Tcherkez *et al.*, 2008). Ceci proposait que l'augmentation de l'intensité photorespiratoire pouvait augmenter l'activité du cycle de Krebs. Mais, chez *S. tuberosum*, des marquages au  $^{14}\text{CO}_2$  avec des lignées antisens pour la GDC ont montré une diminution du taux de décarboxylation lié à la photorespiration

(due à l'inhibition de l'activité GDC) alors que parallèlement, celui lié à la respiration était augmenté chez ces lignées par rapport au contrôle (Bykova *et al.*, 2005). Ceci démontrait qu'une diminution de l'intensité photorespiratoire pouvait augmenter l'activité du cycle de Krebs chez cette plante, contrairement à ce qui avait été observé chez *Xanthium strumarium*. Il reste cependant difficile de comparer ces deux expériences, avec d'un côté, le comportement métabolique de mutants photorespiratoires, et d'un autre côté, des plantes sauvages transférées quelques heures dans des atmosphères plus ou moins physiologiques.

### 3) Interactions avec l'assimilation d'azote

Chez les plantes, l'azote est prélevé au niveau des racines sous forme de nitrates et d'ammonium *via* des transporteurs de nitrate (NRT; Krapp *et al.*, 2014) et d'ammonium (AMT; Ludewig *et al.*, 2007). Les nitrates peuvent être convertis en ammonium, *via* l'activité de la nitrate réductase (NR) et de la nitrite réductase (NiR), et ensuite l'ammonium peut être assimilé par le cycle GS/GOGAT dans les racines. Les nitrates peuvent aussi être transportés vers les feuilles *via* les vaisseaux conducteurs du xylème pour y être assimilés (voir Xu *et al.*, 2012). Dans les feuilles, les nitrates peuvent être stockés dans la vacuole ou réduits en nitrite dans le cytosol par la NR avec la consommation de pouvoir réducteur sous forme de NADH. Le nitrite est transporté dans le chloroplaste où il est réduit en ammonium par la NiR avec la consommation de pouvoir réducteur sous forme de Fd<sub>réduite</sub>. L'ammonium inorganique est ensuite fixé sur le glutamate par la GS2 avec consommation d'ATP pour former de la glutamine. Le glutamate est régénéré à partir de la glutamine et du 2-OG par la Fd-GOGAT en utilisant de la Fd<sub>réduite</sub> (Lillo, 2008).

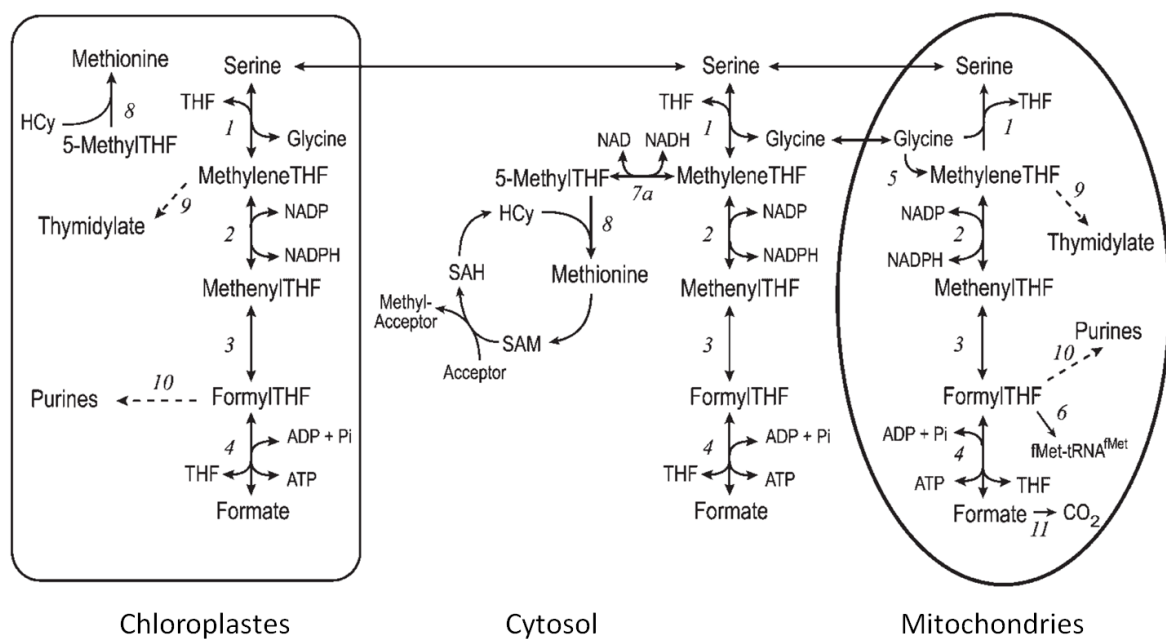
L'activité photorespiratoire du complexe GDC produit 10 fois plus d'ammonium que la réduction des nitrates (Keys *et al.*, 1978), et il est en grande partie réassimilé par le cycle GS2/Fd-GOGAT1 dans les feuilles (Somerville et Ogren, 1980a ; Coshigano *et al.*, 1998). Aussi, la GGT a besoin du glutamate pour son activité, donc la photorespiration va consommer du glutamate. Or, la plante a besoin de glutamate pour assimiler l'ammonium *via* la GS2, mais aussi pour la biosynthèse d'autres acides aminés, et d'autres métabolites azotés. Ainsi, l'activité photorespiratoire pourrait impacter directement sur l'activité du cycle GS/GOGAT et indirectement sur l'assimilation des nitrates et l'homéostasie des acides aminés.

L'assimilation des nitrates dans les feuilles peut être déterminée à partir de mesures d'échanges gazeux foliaires, en calculant le quotient assimilatoire de nitrates (AQ) (Bloom *et al.*, 1989). Cet AQ correspond au ratio entre la consommation nette de CO<sub>2</sub> sur la production nette d'O<sub>2</sub> par la feuille. A la lumière, le transfert des électrons du nitrate vers le nitrite utilise la ferredoxine et augmente donc la production d'O<sub>2</sub> par la phase photochimique de la photosynthèse tandis que les réactions utilisant le CO<sub>2</sub> restent stables (dans des conditions d'intensité lumineuse non-limitante pour la photosynthèse). Ainsi les plantes qui assimilent moins de nitrates auront un AQ plus faible, et la différence de AQ ( $\Delta$ AQ) obtenue avec un transfert de source d'azote (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> vers NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) sera proportionnelle à l'assimilation des nitrates (Bloom *et al.*, 2002). Grâce à cette technique de mesure, il a été montré que :

- Les feuilles d'orge assimilent moins de nitrates dans 700  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> dans l'air par rapport à l'air, dès 1200  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Bloom *et al.*, 2002).
- Les feuilles d'*A. thaliana* assimilent moins de nitrates dans 700  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> dans l'air par rapport à l'air ou dans de l'air à 2% O<sub>2</sub> par rapport à l'air, dès 300  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Rachmilevitch *et al.*, 2004).

Par la suite, ces observations ont été confirmées en mesurant l'absorption et l'assimilation des nitrates par trois méthodes différentes : un épuisement des nitrates, des marquages au <sup>15</sup>N ou des marquages au <sup>14</sup>N. Dans tous les cas, les feuilles de plantes transférées à 700  $\mu\text{L.L}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> dans l'air ou dans de l'air à 2% O<sub>2</sub> absorbaient et assimilaient moins de nitrates par rapport à celles transférées à l'air (Bloom *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que la diminution de l'activité photorespiratoire inhibe l'assimilation et l'absorption des nitrates chez les plantes. Trois mécanismes physiologiques ont été proposés pour expliquer l'inhibition de l'assimilation des nitrates par de plus fortes concentrations en CO<sub>2</sub> que l'air (700  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) (Bloom, 2015) :

- Le transport des nitrites dans les chloroplastes est inhibé en fort CO<sub>2</sub> (Bloom *et al.*, 2002).
- La forte utilisation de Fd<sub>réduite</sub> pour la production de NADPH par la FNR en fort CO<sub>2</sub> pourrait limiter l'activité de la NiR et par conséquent l'assimilation des nitrates (Bloom, 2015).
- La photorespiration stimulerait l'export du malate en dehors du chloroplaste, et par conséquent la disponibilité en NADH dans le cytosol *via* la valve malate (Igamberdiev *et al.*, 2001). Ceci pourrait promouvoir l'activité de la NR (Quesada *et al.*, 2000). Par contre une diminution de l'activité photorespiratoire pourrait réduire l'export du pouvoir réducteur et donc rendre limitante la réduction des nitrates en nitrites par la NR.



**Figure 11. Vue d'ensemble du métabolisme C<sub>1</sub> chez les plantes.** 1, SHMT ; 2, 5,10-méthylène-THF déshydrogénase à NADP (MTHFD) ; 3, 5,10-méthényl-THF cyclohydrolase à NAD (MTHFC) ; 4, 10-formyl-THF synthétase (FTHFS) ; 5, GDC ; 6, méthionyl-tRNA formyl transférase ; 7a, 5,10-méthylène-THF réductase à NADH (MTHFR) ; 8, méthionine synthase ; 9, thymidylate synthase ; 10, phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransférase (AICART) et phosphoribosylglycinamide formyltransférase (GART) ; 11, formate déshydrogénase. SAM, S-adenosylméthionine ; SAH, S-adenosylhomocystéine. (d'après Christensen et MacKenzie, 2006).

#### 4) Interactions avec le métabolisme C<sub>1</sub>

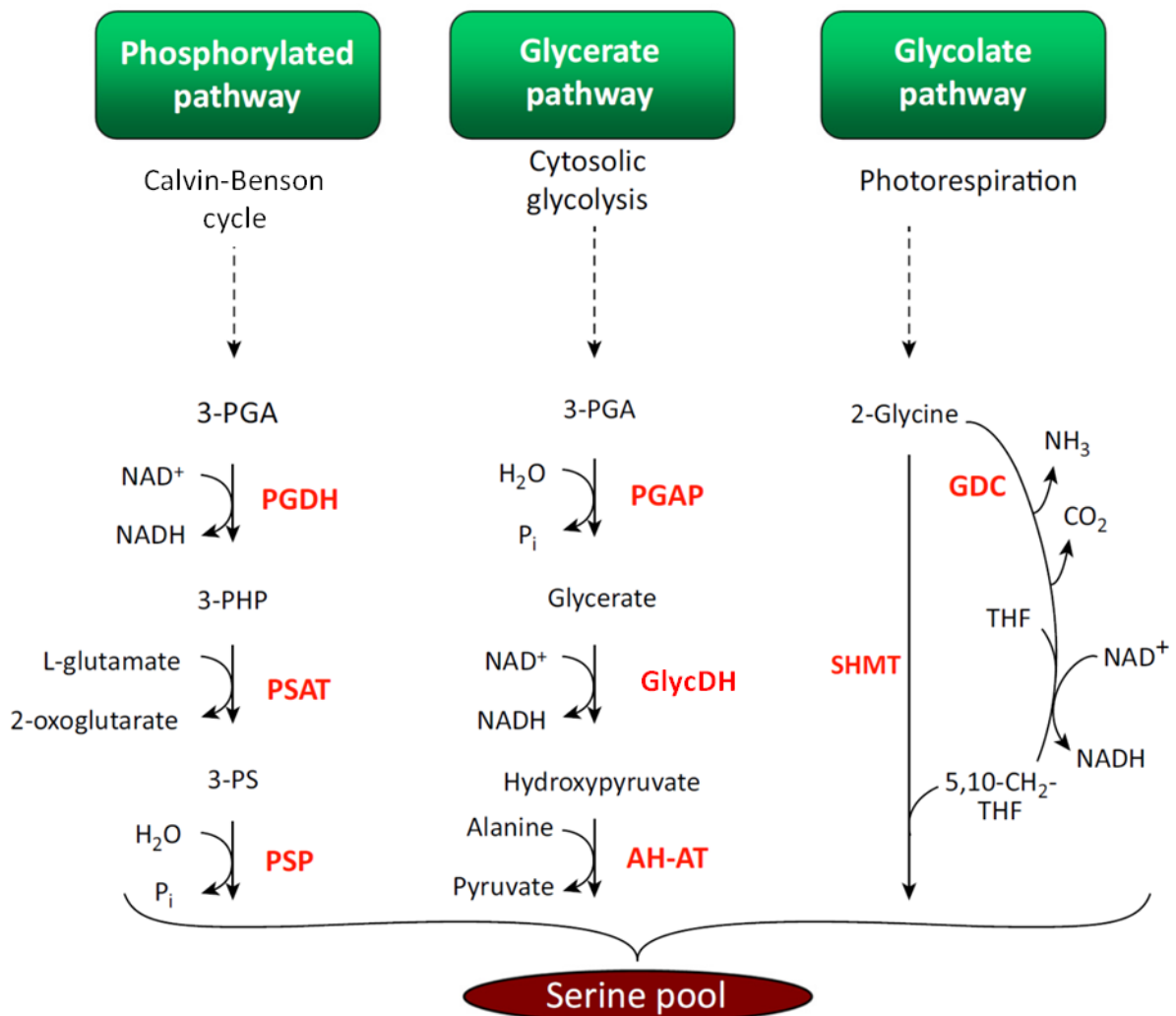
Le métabolisme C<sub>1</sub> est associé au transfert d'unités à un carbone par la forme active de l'acide folique, le tétrahydrofolate (THF). Ce dernier est composé d'un noyau tétrahydroptéridine associé à la moitié d'un acide p-aminobenzoïque, lui-même associé à une chaîne polyglutamate. Les unités de carbone transférées peuvent être des groupements méthyles (CH<sub>3</sub>), méthylènes (CH<sub>2</sub>), méthényle (CH) ou formyle (CHO) et ils sont fixés sur les positions N5 et N10 du noyau ptéridine (Hanson et Gregory, 2011). Le métabolisme C<sub>1</sub> n'est pas encore très connu chez les plantes à l'heure actuelle, mais il a été longuement étudié chez les bactéries et les mammifères. L'analyse du génome d'*A. thaliana* par rapport à celui d'autres espèces végétales ou d'autres organismes, a mis en évidence certains gènes codant des enzymes de cette voie métabolique (Hanson *et al.*, 2000). Dans les cellules de plantes, plusieurs coenzymes du folate avaient déjà été identifiés dans les chloroplastes, les mitochondries et le cytosol, suggérant que le métabolisme C<sub>1</sub> pouvait se dérouler dans ces différents compartiments (Figure 11) (Cossins & Shah, 1972).

Le métabolisme C<sub>1</sub> joue un rôle fondamental dans la synthèse de nombreux métabolites. En effet, certaines formes du THF sont utilisées comme des cofacteurs donneurs de groupements à un carbone par plusieurs enzymes de voies de biosynthèse :

- Le 5,10-méthylène-THF peut être converti en dihydrofolate par la thymidylate synthase pour la synthèse de thymidine monophosphate (TMP) à partir d'uridine monophosphate (UMP) (Arooj *et al.*, 2013). Le TMP est directement utilisé pour la synthèse d'ADN, et d'ARN.
- Le 5,10-méthylène-THF est utilisé par la SHMT pour produire de la sérine à partir de la glycine (Bauwe et Kolukisaoglu, 2003).
- Le 10-formyl-THF peut être converti en THF par les enzymes GART et AICART dans la voie de biosynthèse de l'adénosine monophosphate (AMP), utilisé pour la synthèse d'ADN, et d'ARN (Zrenner *et al.*, 2006). Le 10-formyl-THF serait aussi utilisé par la méthionyl ARN-t transformylase pour l'ajout d'un groupement formyle sur un méthionyl ARN-t méthylé.
- Le 5-méthyl-THF peut être converti en THF par la méthionine synthase pour la production de méthionine à partir d'homocystéine (Hesse *et al.*, 2004).

Des marquages avec du  $^{35}\text{SO}_4^{2-}$  chez *Lemna* ont montré qu'environ 80% de la méthionine produite *de novo* via l'activité de la méthionine synthase était utilisée pour la synthèse des protéines (Giovannelli *et al.*, 1985). Cette enzyme utilise le 5-méthyl-THF comme cofacteur, et cela démontre donc un rôle majeur du métabolisme C<sub>1</sub> dans la production de méthionine chez les plantes pour la synthèse des protéines. De plus, la méthionine peut être transformée en S-adenosylméthionine, qui servira par la suite de donneur de groupe méthyle pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des polyamines, des phytosidérophores, de nicotianamine, de l'éthylène mais aussi pour enzymes de type O-méthyltransférases et N-méthyltransférases (Roje, 2006).

La photorespiration interagit fortement avec le métabolisme C<sub>1</sub> via les activités des enzymes GDC et SHMT. Lors du cycle photorespiratoire, la protéine T du complexe GDC utilise le THF comme cofacteur pour accepter un groupement méthyle de la glycine (formation de 5,10-méthylène-THF). Tandis que l'enzyme SHMT utilise le 5,10-CH<sub>2</sub>-THF comme cofacteur, pour transférer un groupement méthyle sur une molécule de glycine (formation de sérine et de THF). Bien que ce cycle entre le THF et le 5,10-méthylène-THF paraisse futile, les doubles mutants *gldp1-1xgldp2-2* et *shmt1-1xshmt2-2* ne sont pas viables dans l'air (arrêt de la croissance au stade 2 cotylédons pour *gldp1-1xgldp2-2* et pas de germination pour *shmt1-1xshmt2-2*) et en fort CO<sub>2</sub> (9 mL.L<sup>-1</sup>) (meurent ou ne produisent pas de graines) (Engel *et al.*, 2007; Engel *et al.*, 2011). Le fait que ces mutants ne soient pas viables dans des conditions où la photorespiration est fortement réduite serait la conséquence d'une altération du métabolisme C<sub>1</sub> et cela souligne l'importance du maintien de l'activité des enzymes GDC et SHMT pour le fonctionnement de ce métabolisme. De plus, un double mutant « knock-out » pour les deux gènes codant la 10-formyl-THF déshydrogénase a été identifié chez *A. thaliana* (Collakova *et al.*, 2008). Il présente un retard de croissance dans l'air après trois semaines de croissance, qui est absent en conditions de fort CO<sub>2</sub> (4 mL.L<sup>-1</sup>) (mutant de classe III). Après un court transfert de fort CO<sub>2</sub> à l'air, le mutant présente une forte accumulation de glycine, semblable au mutant *shm1-1*. Dans l'air, il accumule une forte quantité de 5-formyl-THF, mais aussi 1,3 fois plus de 10-formyl-THF et 5,10-méthylène-THF (Collakova *et al.*, 2008). La 10-formyl-THF déshydrogénase est donc essentielle à la production de 5,10-méthylène-THF pour l'activité de la SHMT lors de la photorespiration (Collakova *et al.*, 2008). Une autre interaction possible entre la photorespiration et le métabolisme C<sub>1</sub> serait la production de formate par décarboxylation du glyoxylate dans le peroxysome. Des marquages au  $^{14}\text{C}$ -glycolate réalisés avec des



**Figure 12.** Les différentes voies de biosynthèse de la sérine chez les plantes. La voie du glycolate utilise la voie photorespiratoire. La voie du glycérate utilise le 3-PGA produit dans le cytosol par la glycolyse. La voie phosphorylée de la sérine utilise le 3-PGA produit dans les chloroplastes par le cycle de Calvin-Benson (photosynthèse/photorespiration). PGDH, 3-PGA déshydrogénase ; PSAT, 3-phosphosérine aminotransférase ; PSP, 3-phosphosérine phosphatase ; PGAP, 3-PGA phosphatase ; GlycDH, glycérate déshydrogénase ; AH-AT, alanine:hydroxypyruvate aminotransférase ; GDC, glycine décarboxylase ; SHMT, sérine hydroxyméthyl transférase ; THF, tétrahydrofolate ; 5,10-CH<sub>2</sub>-THF, 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (Roc *et al.*, 2014).



chloroplastes d'épinard, de tabac et de maïs ont montré que 80% du marquage du glycolate était reparti équitablement entre le glyoxylate et le formate (Zelitch, 1973). La décarboxylation du glyoxylate était spontanée à pH 8, et inhibée en présence de l'enzyme catalase, suggérant un rôle de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans cette réaction (Zelitch, 1973).

## 5) Les voies de biosynthèse de la sérine chez la plante

Chez les plantes, la sérine est produite et utilisée par le cycle photorespiratoire au cours du recyclage des carbones du 2-PG en 3-PGA. Elle est aussi utilisée pour la synthèse des protéines, la synthèse des sphingolipides et des phospholipides, la synthèse de la glycine et le fonctionnement du métabolisme  $\text{C}_1$ . Chez les plantes, il existe trois voies de production de la sérine (voir Roc *et al.*, 2014). La voie majeure dans les tissus photosynthétiques utilise le cycle photorespiratoire (la voie du glycolate) mais il existe aussi deux voies non-photorespiratoire: la voie du glycérate et la voie phosphorylée.

**La voie du glycolate** permet la synthèse de la sérine à partir de la glycine à la lumière dans les tissus photosynthétiques, *via* l'activité de la SHMT photorespiratoire, qui transfère le groupement méthyle du 5,10-méthylène-THF sur 1 molécule de glycine pour former 1 molécule de sérine. La production du 5,10-méthylène-THF est réalisée par la GDC, qui transfère un groupement méthyle de la glycine sur le THF, avec la production de 1 molécule de  $\text{CO}_2$ , 1 molécule de  $\text{NH}_3$  et 1 molécule de NADH dans la mitochondrie (Figure 12).

**La voie du glycérate** permet de produire de la sérine à partir du 3-PGA en trois étapes. Le 3-PGA est d'abord déphosphorylée en glycérate dans le cytosol par la 3-PGA phosphatase, et il est ensuite transporté dans le peroxysome, où il est transformé en hydroxypyruvate *via* l'activité de la glycérate déshydrogénase. L'hydroxypyruvate est ensuite converti en sérine dans le peroxysome *via* une alanine:hydroxypyruvate aminotransférase. La présence de ces enzymes ainsi que de leurs activités *in vivo* ont déjà été démontrées. Cette voie fonctionne probablement à l'obscurité, et/ou dans les tissus non-photosynthétiques mais sa signification fonctionnelle reste à déterminer.

**La voie phosphorylée** de la sérine permet aussi de produire de la sérine à partir du 3-PGA en trois étapes. Le 3-PGA est transformé dans le chloroplaste par la 3-PGA déshydrogénase (PGDH) en 3-phosphohydroxypyruvate, qui va devenir par la suite de la 3-phosphosérine *via*



l'activité de la 3-phosphosérine aminotransférase (PSAT) qui va transformer le glutamate en 2-OG pendant la réaction. Puis la 3-phosphosérine est déphosphorylée dans le chloroplaste et/ou le cytosol pour produire de la sérine via l'activité de la 3-phosphosérine phosphatase (PSP). Chez *A. thaliana*, 3 gènes codent la PGDH : *PGDH1* (ou *EDA9*), At4g34200 ; *PGDH2* (ou *PGDH*), At1g17745 ; *PGDH3* (ou *3-PGDH*), At3g19480) (Benstein *et al.*, 2013 ; Toujani *et al.*, 2013). Ces trois gènes sont exprimés dans les feuilles et les racines, mais *PGDH1* est aussi fortement exprimé dans les grains de pollen, les graines et les embryons (Benstein *et al.*, 2013; Toujani *et al.*, 2013). Bien qu'un mutant pour *PGDH2* ne présente pas de phénotype morphologique dans l'air, ses feuilles accumulent 20% de sérine en moins que le contrôle, et ses racines en accumulent 40% en moins. Ceci démontre que la voie phosphorylée de production de la sérine pourrait s'opérer dans les racines et les feuilles. La voie phosphorylée de production de la sérine pourrait aussi s'opérer dans les fleurs et le pollen, avec un rôle majeur dans le développement du pollen, de l'embryon et à des stades postembryonniques. L'analyse de mutants homozygotes pour les gènes *PGDH1* (Benstein *et al.*, 2013 ; Toujani *et al.* 2013) et *PSP1* (At1g18640) (Cascales-Miñana *et al.*, 2013) chez *A. thaliana* a révélé qu'ils étaient embryon-létaux (« early curled cotyledon »). De plus, l'expression des gènes *PGDH1* et *PSP1* est essentiel au développement du pollen (Toujani *et al.*, 2013 ; Cascales-Miñana *et al.*, 2013). Le mutant *psp1* a aussi un phénotype racinaire (« short root ») qui était absent en présence d'un apport de sérine endogène (Cascales-Miñana *et al.*, 2013).

Des lignées d'ARN interférence dirigé contre *PGDH1* chez *A. thaliana* présentent un très léger retard de croissance dans l'air. Ce retard s'intensifie après un transfert en fort CO<sub>2</sub> (3000 µL.L<sup>-1</sup>), et il est accompagné d'une diminution de la quantité de sérine par rapport au contrôle. De plus, le gène *PGDH1* est induit (6 fois plus d'ARN) par un transfert d'air ambiant en fort CO<sub>2</sub> (Benstein *et al.*, 2013). Ces résultats suggèrent fortement que cette voie joue aussi un rôle essentiel dans la production de la sérine dans les feuilles en conditions faiblement photorespiratoires, par exemple pendant la nuit. Par ailleurs, les isoformes PGDH1 et PGDH3 sont inhibées *in vitro* par la L-sérine ce qui n'est le cas de la PGDH2, impliquant que cette isoforme pourrait fonctionner lorsque les concentrations en sérine sont élevées chez la plante (Benstein *et al.*, 2013).

## IV. La régulation concertée des enzymes de la photorespiration

### 1) Transcriptionnelle

#### a) La lumière

L'expression de plusieurs gènes photorespiratoires est augmentée lors d'une transition obscurité/lumière chez différentes espèces végétales. Chez le concombre, la quantité de transcrits de la HPR et de la SGAT augmente dans les cotylédons après seulement deux heures de transfert à la lumière. Ceci est corrélé avec une augmentation des activités respectives *in vitro* (Hondred *et al.*, 1987). Chez le tabac, des plantules étiolées (germination pendant 7 à 10 jours à l'obscurité) montrent une augmentation de la quantité de transcrits de la petite sous-unité de la RuBisCO, de la protéine H du complexe GDC (Srinivasan et Oliver, 1995) et de la GOX (Barak *et al.*, 2001) après 10 heures de transfert à la lumière. Chez *A. thaliana*, la quantité de transcrits de la RuBisCO activase et de la petite sous-unité de la RuBisCO de feuilles de rosettes de plantes âgées de 5 semaines suit le rythme circadien (14h de jour/10h de nuit) avec une forte accumulation pendant la photopériode (Pilgrim *et al.*, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus pour la quantité de transcrits de *SHMT1* et *SHMT4* dans des plantules exposées à un cycle 12h de jour/12h de nuit (McClung *et al.*, 2000). Cependant, *SHMT1* était fortement exprimée dans les cotylédons et *SHMT4* dans les racines (McClung *et al.*, 2000). Aussi, la quantité de transcrits de *CAT2* suit un rythme circadien avec une forte accumulation au début de la photopériode. Le gène *CAT3*, non impliqué dans la photorespiration, montre une oscillation circadienne inverse à celle de *CAT2* (Zhong et McClung, 1996). L'ensemble de ces données propose une régulation transcriptionnelle positive et concertée de gènes impliqués dans le cycle photorespiratoire à la lumière. Le besoin de cycler les transcrits selon la transition jour/nuit pourrait être lié à la nécessité de recycler le 2-PG produit par la RuBisCO à la lumière. En effet, certaines protéines photorespiratoires (GOX, SGAT, HPR) présentent une demi-vie autour de 12 h avec une constante de dégradation (Kd) entre 0,16 (HPR) à 0,27 (GOX) par jour. Par contre d'autres enzymes photorespiratoires chloroplastiques et mitochondriales ont un Kd de 0,04 et 0,12 par jour, respectivement (Nelson *et al.*, 2014).

#### b) Le ratio glycine/sérine dans les feuilles

Le ratio glycine/sérine pourrait contrôler la quantité de transcrits de gènes photorespiratoires. En effet, après 2 semaines de croissance sur milieu MS + 1 mM de sérine, la quantité des

transcrits *GDC-P*, *GDC-T* et *SHMT1* est diminuée d'un facteur 1000, tandis que la quantité de transcrits *PGLP1* augmente très légèrement dans des plantules d'*A. thaliana* (Timm *et al.*, 2013a). A l'inverse, lorsque le milieu MS est supplémenté avec 5 mM de glycine, les transcrits *GDC-P*, *GDC-T* et *SHMT1* s'accumulent 4 à 6 fois plus et ceux de *PGLP1* et *GLYK* s'accumulent très légèrement (Timm *et al.*, 2013a). Par ailleurs, le mutant *hpr1*, accumulant 100 fois plus de glycine à la lumière après 5 semaines de croissance dans l'air, montre une plus faible expression des gènes *GDC-P*, *GDC-T*, *SHMT1* et *GLYK* après 5 semaines de croissance dans l'air par rapport au contrôle (Timm *et al.*, 2013a).

## 2) Post-traductionnelle

A ce jour, aucune étude n'a mis en évidence une régulation globale des activités des enzymes photorespiratoires par une modification post-traductionnelle commune. Par contre, des modifications post-traductionnelles ont été identifiées sur plusieurs enzymes photorespiratoires et pourraient donc jouer un rôle dans la régulation (à court terme) de la photorespiration.

### a) La nitrosylation

La S-nitrosylation des protéines correspond à la fixation d'un groupement NO (oxyde nitrique), hautement réactif, sur un résidu cystéine ou homocystéine. Le NO est essentiellement synthétisé par les NO synthases chez les plantes, et est impliqué dans la réponse à des stress abiotiques (stress salin, métaux lourds, forte température, stress osmotique) et biotiques (induction de gènes de défenses contre les pathogènes, réaction hypersensible) (Abat *et al.*, 2008b).

Chez *K. pinnata* et *A. thaliana*, les petites et grandes sous-unités de la RuBisCO (RBCS et RBCL) des feuilles peuvent être S-nitrosylées après 20 minutes d'incubation dans de l'air contenant du NO (Abat *et al.*, 2008a; Lyndermair *et al.*, 2005). Chez *K. pinnata*, cette nitrosylation inhibe l'activité de la RuBisCO *in vitro* et *in vivo* (Abat *et al.*, 2008b). Récemment, plusieurs enzymes photorespiratoires ont été identifiées comme étant S-nitrosylées *in vivo* dans les peroxysomes de *P. sativum* (GDC, GOX, HPR, SGAT, et CAT). De plus, la nitrosylation de l'enzyme GOX peut inhiber son activité *in vitro* chez *P. sativum* (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). Chez *A. thaliana*, les protéines P et H du complexe GDC et les enzymes SHMT et CAT3 des feuilles de rosettes peuvent être S-nitrosylées après 1 h

**Tableau 2.** Phospho-peptides identifiés sur les enzymes photorespiratoires d'*A. thaliana* (données PhosPhAt, Hodges et al., 2013 et données non publiées de l'équipe)

Protéine	Nom	Gène	Phospho-peptides	Localisation	Echantillon
Phosphoglycolate phosphatase	PGLP1	At5g36700	LIEGVPE(pT)LDMLR	96-108 / 362	Feuille cauline
			TLLVLSGV(pT)SISMLESPEK	322-341 / 362	Feuille cauline
			ISDFL(pS)PK	351-358 / 362	Rosette
Glycolate oxydase	GOX1	At3g14420	(pT)LLVLSGVTSISMLESPEK	322-341 / 362	Culture cellulaire
			MEI(pT)NVTEYDAIAK	1-14 / 367	Feuilles
			AIALTV(pT)PRL	151-161 / 367	Rosette
	GOX2	At3g14415	NHITTEWD(pT)PR	C-terminal	Rosette
			MEI(pT)NVTEYDAIAK	1-14 / 367	Feuilles
			AIALTV(pT)PRL	151-161 / 367	Rosette
Aminotransférases	SGAT	At2g13360	NHITTEWD(pT)PR	C-terminal	Rosette
	GGAT1	At1g23310	AL(pS)LPTGLGIVCASPK	202-217 / 401	Feuille cauline
Complexe glycine décarboxylase	GDH1	At2g35370	ALD(pY)DTLNENVK	5-16 / 481	Culture cellulaire
			EY(pT)KFLEEEDAAH	153-165 / 165	Feuille cauline
			VKP(pS)SPAELESLMGPK	137-152 / 165	Feuille cauline
	GDH3	At1g32470	VKPS(pS)PAELESMLGPK	137-152 / 165	Rosette
			EY(pT)KFLEEEDAAH	154-166 / 166	Feuille cauline
			(s)HLLPAF(s)I(s)R	32-42 / 166	Rosette
	GPD1	At4G33010	VKPS(pS)PAELEALMGPK	137-152 / 165	Rosette
			R(pY)IHKLQSK	556-564 / 1037	Graine
			ADGFDLKVVVT(pS)DLK	257-270 / 1037	Culture cellulaire
	LPD1	At1g48030	TPFT(pS)GLDLEK	315-325 / 507	Culture cellulaire
Sérine hydroxyméthyl transférase	SHMT1	At4g37930	pS)LPGITIDEK	187-196 / 507	Plantule
			GKPYEG(s)I(t)K	387- 396 / 408	Culture cellulaire
			V(pT)DEHI(pY)LVVNAGCRDK	138-154/408	Plantule
			N(pT)VPGDVSAMVPGGIR	415-430 / 517	Feuille cauline
			(pS)LPSEAVDEKER	31-42 / 517	Rosette
Hydroxypyruvate réductase	HPR1	At1g68010	(pS)LPSEAVDEK	31-40 / 517	Rosette
			EGMA(pT)LAALNVLGR	330-343 / 387	Feuille cauline
			AS(pS)MEEVLR	229-238 / 387	Rosette

d'incubation avec la harpine (Palmieri *et al.*, 2010), un éliciteur bactérien induisant la production de NO dans les mitochondries (Garmier *et al.*, 2007 ; Palmieri *et al.*, 2010). La S-nitrosylation des protéines P1, P2, H1, L1 et L2 du complexe GDC inhibait l'activité GDC *in vitro* (Palmieri *et al.*, 2010). Ainsi, l'ensemble de ces données montre que la S-nitrosylation des protéines GOX1, GDC-P, GDC-H, RBCL et RBCS inhibe leurs activités *in vivo*.

### **b) La phosphorylation protéique**

La phosphorylation des protéines correspond à l'ajout d'un groupement phosphate sur un résidu sérine, thréonine, tyrosine ou histidine, catalysé par des kinases. C'est probablement l'une des modifications post-traductionnelles les plus répandues chez tous les organismes. La phosphorylation/déphosphorylation peut moduler l'activité, la localisation subcellulaire, la stabilité des protéines et leurs interactions respectives (voir Hodges *et al.*, 2013).

Plusieurs phosphopeptides appartenant à des protéines photorespiratoires ont été identifiées par des études de phosphoprotéomiques (voir Tableau 2 (données PhosPhAt, Hodges *et al.*, 2013 et données non publiées de l'équipe)). En effet, toutes les enzymes photorespiratoires sauf la glycérate kinase sembleraient être phosphorylées. Dans les feuilles d'*A. thaliana*, on trouve des phosphopéptides pour PGLP1, GOX1/2, SGAT, les protéines H1/3 du complexe GDC, SHMT1, et HPR1/2. D'autres phosphopeptides ont été identifiés dans des cultures cellulaires d'*A. thaliana* (PGLP1, GGAT1, et les protéines P1/2 et T1 du complexe GDC). Ces données proposent une régulation globale de la photorespiration par phosphorylation, cependant, l'effet de ces phosphorylations sur l'activité des enzymes *in vitro* et *in planta* n'est pas encore connu. Certains de ces phosphopeptides ont été trouvés dans des conditions d'anoxie (GOX1/2), de manque d'azote/réalimentation en nitrate (PGLP1, GGAT1, protéines GDC-P et T), manque de phosphate/ réalimentation (GDC-P1/2 protéine) ou à la fin de la nuit (protéine GDC-H) (voir Hodges *et al.*, 2013).

## **V. La glycolate oxydase**

### **1) La GOX chez *A. thaliana***

Comme décrit auparavant, la glycolate oxydase (EC 1.1.3.15 ; GOX) catalyse l'oxydation du glycolate en glyoxylate avec la production de peroxyde d'hydrogène. Elle appartient à la

**Tableau 3. Récapitulatif des cinq isoformes de type GOX présentes chez *A. thaliana***

Nom	Gène	Expression majeure	Masse moléculaire	Substrat préféré	Références
GOX1	At3g14420	Feuilles	40.3 kDa	Glycolate	Engqvist <i>et al.</i> , 2015 Dellero <i>et al.</i> , 2015a
GOX2	At3g14415	Feuilles	40.9 kDa	Glycolate	
GOX3	At4g18360	Racines	40.5 kDa	Glycolate/Lactate	
HAOX1	At3g14130	Graines	39.8 kDa	Acide 2-hydroxydodecanoïque	Esser <i>et al.</i> , 2014
HAOX2	At3g14150	Graines	40.1 kDa	Acide leucique	

superfamille des  $\alpha$ -hydroxyacide oxydases. Elle utilise la flavine mononucléotide (FMN) comme cofacteur. Il existe deux types de glycolate oxydases: les GOX qui utilisent préférentiellement des  $\alpha$ -hydroxyacides à chaîne courte (comme le glycolate et le lactate) (Hackenberg *et al.*, 2011) et les IHAOX qui utilisent préférentiellement des  $\alpha$ -hydroxyacides à chaîne longue (comme l'acide 2-hydroxy hexanoïque, l'acide 2-hydroxy octanoïque et l'acide 2-hydroxy decanoïque) (Esser *et al.*, 2014). Chez les plantes, la GOX sert principalement dans la photorespiration *via* la production de glyoxylate pour la synthèse de la glycine dans les peroxysomes de feuilles (Bauwe *et al.*, 2010; Hackenberg *et al.*, 2011). Chez l'Homme, la GOX (ou HAOX1) sert dans la voie de biosynthèse de la glycine dans les peroxysomes des reins, du foie et du pancréas (Jones *et al.*, 2000). Cependant, chez les mammifères, le glyoxylate produit peut aussi servir à la production d'oxalate (Richardson et Tolbert, 1961), et c'est donc une cible de choix pour traiter l'hyperoxalurie par des inhibiteurs pharmacologiques contre l'activité de cette enzyme. Chez l'Homme, les IHAOX sont responsables de la dégradation des  $\alpha$ -acides gras dans les reins et le foie (Verhoeven *et al.*, 1998).

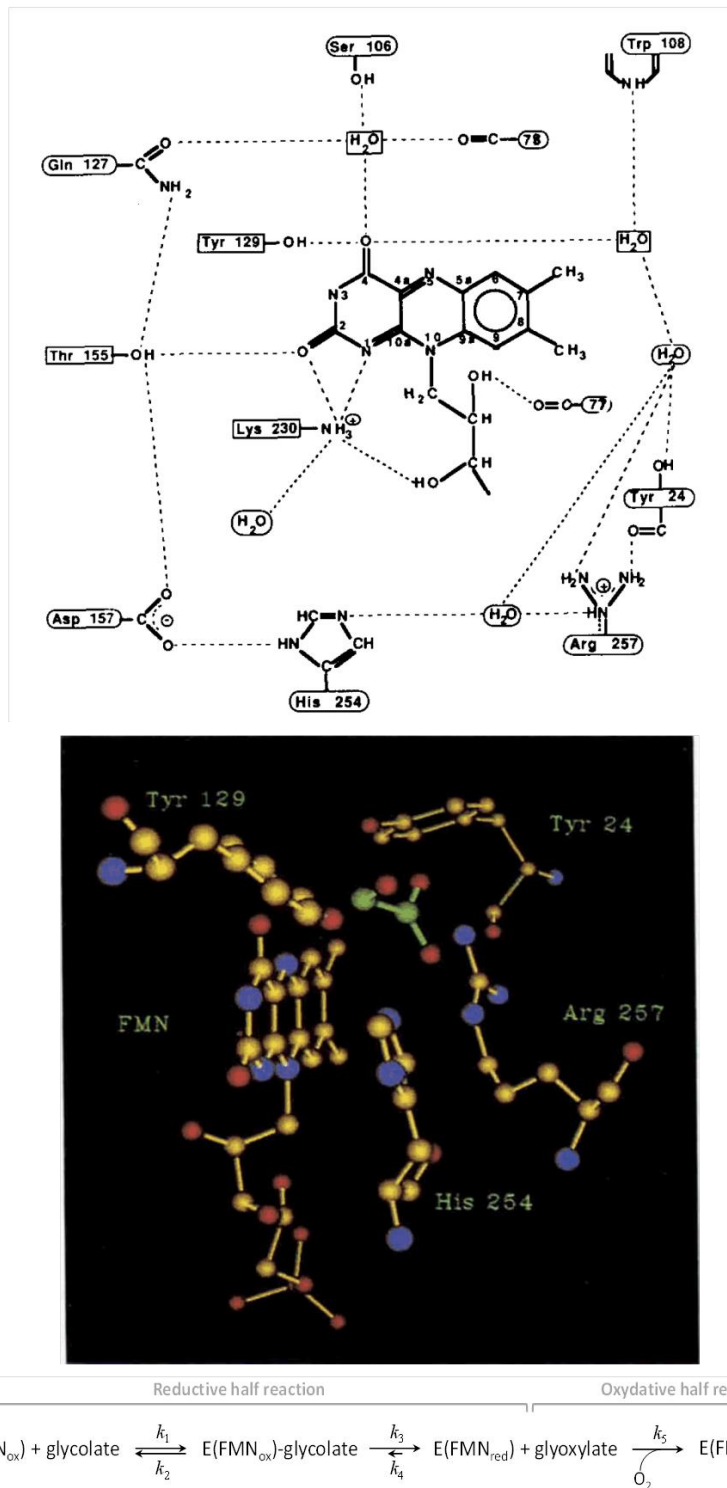
Récemment, une analyse phylogénétique, basée sur l'inférence phylogénétique bayésienne ainsi que sur la spécificité de substrat (mesurée expérimentalement ou prédite à partir de la séquence d'acides aminés et la structure de la protéine), à partir de séquences protéiques de GOX, de IHAOX et de lactate oxydases (LOX), a suggéré que la première GOX eucaryote aurait évolué à partir d'une LOX bactérienne (Esser *et al.*, 2014). Puis cette GOX eucaryote aurait évolué indépendamment chez les plantes et les mammifères pour donner, par duplication, les GOX et les IHAOX. Les plantes auraient possédé une LOX provenant de cyanobactéries, mais elle aurait été perdue pendant l'évolution (Esser *et al.*, 2014). Cependant, d'autres analyses phylogénétiques à partir de séquences protéiques de GOX et de LOX de plantes, de cyanobactéries, d'algues et de bactéries et des analyses biochimiques de GOX de plantes et de LOX d'algue et de cyanobactéries proposent que la GOX de plantes aurait évolué à partir d'une LOX d'origine cyanobactérienne (Hackenberg *et al.*, 2011). Chez *A. thaliana*, les différentes GOX putatives forment une famille multigénique comprenant cinq gènes (*GOX1*, At3g14415 ; *GOX2*, At3g14420 ; *GOX3*, At4g18360 ; *HAOX1*, At3g14130 ; *HAOX2*, At3g14150) (Tableau 3). D'après Genevestigator, les gènes *GOX1* et *GOX2* sont environ 60 fois plus exprimés que les autres membres de la famille dans les feuilles de rosette. De plus, les protéines GOX1 et GOX2 sont les isoformes majoritaires dans les peroxysomes

des feuilles d'*A. thaliana* (Reumann *et al.*, 2007). Ces données proposent que *GOX1* et *GOX2* sont les gènes codant les GOX photorespiratoires. Néanmoins, pendant des travaux sur le rôle de la GOX dans la résistance aux pathogènes, il a été démontré que les transcrits pour les cinq gènes *GOX* s'accumulaient de façon équivalente dans les feuilles (Rojas *et al.*, 2012). Bien que ces observations soient contradictoires, des expériences dans le cadre de cette thèse vont montrer que *GOX1* et *GOX2* sont les isoformes impliquées dans la photorespiration. Le gène *GOX3* est exprimé plutôt dans les racines (travaux de cette thèse) et il est induit dans des vieilles feuilles (à partir de 6 semaines) ou par une sénescence induite par l'obscurité (Engqvist *et al.*, 2015). *In vitro*, la *GOX3* recombinante présente une efficacité catalytique trois fois plus grande avec le lactate qu'avec le glycolate (Engqvist *et al.*, 2015). *In vivo*, des expériences de marquage avec du  $^{13}\text{C}$ -L-lactate ou du  $^{13}\text{C}$ -glycolate sur des lignées mutantes et surexprimeurs de *GOX3* ont montré que la *GOX3* utilise préférentiellement le lactate. La *GOX3* est capable de compléter un mutant de levure *cyb2* (gène de la L-lactate cytochrome c oxidoreductase) qui ne pousse pas sur un milieu avec du lactate comme seule source de carbone (Engqvist *et al.*, 2015). Ainsi, l'isoforme *GOX3* pourrait jouer le rôle d'une LOX et d'une GOX. Toujours d'après Genevestigator, les gènes *HAOX1* et *HAOX2* sont essentiellement exprimés dans les graines sèches. *In vitro*, la *HAOX1* recombinante utilise préférentiellement de l'acide 2-hydroxydodecanoïque et la *HAOX2* utilise préférentiellement de l'acide leucique. Les deux isoformes peuvent aussi utiliser l'acide 2-hydroxyhexanoïque et l'acide 2-hydroxyoctanoïque, mais leurs activités sont deux fois plus faibles comparées à celles avec leurs substrats préférentiels (Esser *et al.*, 2014). Ces substrats sont aussi utilisés par les *IHAOX* humaines (Jones *et al.*, 2000) et les *IHAOX* de plantes pourraient donc être impliquées dans le catabolisme des acides gras comme c'est le cas pour les *IHAOX* chez les mammifères (Verhoeven *et al.*, 1998).

## 2) Le mécanisme réactionnel de la GOX

La structure tertiaire de la GOX est un dimère de tétramère chez l'épinard et *A. viridans* (Lindqvist et Bränden, 1985 ; Furuichi *et al.*, 2008). Chez l'épinard, la forme monomérique de la GOX est composée de 16 hélices alpha et 8 feuilletts bêta (Lindqvist et Bränden, 1985). Les résidus Ser<sup>106</sup>, Tyr<sup>129</sup>, Thr<sup>155</sup> et Lys<sup>230</sup> ont été identifiés comme étant très importants pour la stabilisation du cofacteur FMN. Tandis que les résidus Tyr<sup>24</sup>, Tyr<sup>129</sup> et Arg<sup>257</sup> sont impliqués dans la fixation du substrat. Le résidu His<sup>254</sup> serait impliqué dans l'abstraction du proton sur le





**Figure 13.** Acides aminés impliqués dans la fixation et/ou la catalyse de l'activité de la GOX d'épinard. En haut, les interactions primaires et secondaires entre les acides aminés du site actif et le cofacteur FMN (Lindqvist et Brändén, 1989). Au milieu, modèle de fixation du glycolate (en vert et rouge) au sein du site actif, obtenu en recoupant les données cristallographiques de la GOX et la densité du nuage électronique des acides aminés impliqués dans la catalyse (Lindqvist et Brändén, 1989). En bas, mécanisme réactionnel de la GOX d'épinard proposé en accord avec les données expérimentales (Macheroux *et al.*, 1991).

C-2 du glycolate (Lindqvist et Bränden, 1989) (Figure 13). Un rôle équivalent a été mis en évidence pour la LOX (résidu H290) (Müh *et al.*, 1994) et le flavocytochrome b2 (résidu H373) (Tsai *et al.*, 2007) par la mutagenèse du résidu en phénylalanine, avec des activités GOX résultantes quasi-nulles voire nulles pour les protéines recombinantes mutées. Un mécanisme réactionnel pour la GOX d'épinard, mais aussi pour celle de l'Homme a été proposé à partir de cinétiques de gels rapides de la réaction (« stopped-flow gel reaction ») (Figure 13). C'est un mécanisme de ping-pong, composé de deux demi-réactions : l'une réductive et l'autre oxydative. Dans la première réaction, le glycolate est fixé par l'enzyme avec la formation d'un complexe enzyme-substrat de type Michaelien, puis deux protons sont transférés de la position C-2 du glycolate vers le FMN, conduisant à la formation de glyoxylate et de la FMN réduite. Puis, le complexe enzyme-produit est dissocié et le glyoxylate est libéré. Dans la deuxième réaction, le FMN est réoxydé par une molécule d'O<sub>2</sub>, pour former une molécule d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, afin de régénérer le FMN à son état redox initial (Figure 13 ; Macheroux *et al.*, 1991 ; Pennati et Gadda, 2009). Cette dernière étape se déroulait en deux étapes élémentaires distinctes chez la GOX d'Homme (Pennati et Gadda, 2011). Il a déjà été démontré expérimentalement que la demi-réaction réductive était limitante pour la catalyse enzymatique ( $K_{\text{glycolate}} = 1 \text{ mM}$  contre  $K_{\text{O}_2} = 210 \text{ }\mu\text{M}$  ; Macheroux *et al.*, 1991). Cependant, des incertitudes planent sur le premier proton qui est transféré à partir du glycolate. Deux scénarios s'opposent: soit l'attaque du proton situé sur le C-2 du glycolate qui va former un carbanion (état de transition très instable) soit l'attaque du proton situé sur le groupement hydroxyle qui peut se faire de façon concertée avec l'attaque du proton sur le C-2 du glycolate, aboutissant à un transfert d'hydrure (état de transition plus stable) (Stenberg *et al.*, 1995). La connaissance de l'état de transition pourrait permettre de cribler efficacement des inhibiteurs contre cette enzyme (voir Chapitre II.2) c) sur l'inhibition de la RuBisCO par des analogues d'intermédiaires réactionnels).

Certaines GOX de plantes et de mammifères présentent un  $k_{\text{cat}}$  semblable ( $20,8 \text{ s}^{-1}$  chez l'homme,  $20,8 \text{ s}^{-1}$  chez le foie de porc,  $20 \text{ s}^{-1}$  chez l'épinard et  $27 \text{ s}^{-1}$  chez la courge) et un  $K_m$  pour le glycolate semblable ( $200 \text{ }\mu\text{M}$  chez l'Homme,  $420 \text{ }\mu\text{M}$  chez le foie de porc et  $330 \text{ }\mu\text{M}$  chez la courge) (voir Vignaud *et al.*, 2007). Par contre, il déjà a été rapporté que les GOX de plantes en C<sub>4</sub> possédaient un  $K_m$  pour le glycolate ( $10 \text{ }\mu\text{M}$  chez *Amaranthus hypochondriacus* (Devi *et al.*, 1996) ; 20 et  $65 \text{ }\mu\text{M}$  chez le maïs dans les cellules de garde et du mésophylle, respectivement (Devi *et al.*, 1996)) plus faible que celles de plantes en C<sub>3</sub> ( $330 \text{ }\mu\text{M}$  chez *Cucurbita pepo* (Nishimura *et al.*, 1983),  $300 \text{ }\mu\text{M}$  chez le pois (Devi *et al.*, 1996),  $1 \text{ mM}$  chez

l'épinard (Macheroux *et al.*, 1991), 1,9 mM pour la GOX2 (Hackenberg *et al.*, 2011), 187  $\mu$ M pour la GOX1 et 202  $\mu$ M pour la GOX2 d'*A. thaliana* (Engqvist *et al.*, 2015)). Il faut aussi noter que l'activité de la GOX est présente dans les cellules de garde et du mésophylle chez le maïs, bien que la RuBisCO soit localisée uniquement dans les cellules du mésophylle (Devi *et al.*, 1996).

### 3) Mutants de la GOX déjà caractérisés dans la littérature

Chez *A. thaliana*, les cinq simples mutants « knock-out » pour chaque gène codant une GOX/HAOX ont été identifiés : SAIL177\_G11 (*gox1*), SALK\_044052 (*gox2*) GK\_523D09 (*gox3* et *gox3-1*), SALK\_020909 (*gox3-2*), SAIL\_1156-F03 (*gox3-3*), SAIL84\_A04 (*haox1*) et SALK102409 (*haox2*) (Rojas *et al.*, 2012 ; Engqvist *et al.*, 2015). Ils ne présentent pas de phénotype photorespiratoire après 4 semaines de croissance sur milieu MS, avec environ 20% d'activité GOX dans les feuilles par rapport au contrôle (Rojas *et al.*, 2012) ou bien après 8 semaines de culture sur terreau (Engqvist *et al.*, 2015). Par contre, les racines des mutants *gox3-1/2/3* étaient plus courtes par rapport aux contrôles en présence de 1 mM de lactate (Engqvist *et al.*, 2015).

Chez le tabac, des lignées qui sous-expriment la GOX ont été générées accidentellement par leur transformation avec une construction permettant l'expression de la GOX de la courge sous le contrôle d'un promoteur 35S du virus de la mosaïque du tabac (35S *CaMV*). Les lignées *go3* et *go21* présentaient un tiers de l'activité GOX du contrôle, ainsi qu'un retard de croissance dans l'air (Yamaguchi et Nishimura, 2000). Le retard de croissance dans l'air de la lignée *go21* était absent sous faible intensité lumineuse (30  $\mu$ mol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>). Après un transfert de 30 à 500  $\mu$ mol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> pendant 8 h dans l'air, cette lignée présentait une diminution du ratio  $F_v/F_m$ . Des mesures de fluorescence chlorophyllienne ont montré que plus l'activité GOX était faible, plus le transfert d'électrons photosynthétique était réduit et le NPQ plus élevé, sous 600  $\mu$ mol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> d'intensité lumineuse (Yamaguchi et Nishimura, 2000).

Chez le riz, des lignées contenant une construction permettant l'expression du gène *OsGLO1* en antisens sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'oestradiol ont été caractérisées. En dessous de 40% d'activité GOX foliaire restante par rapport au contrôle, les lignées présentaient une inhibition de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, associée à une diminution du

transfert d'électrons photosynthétique et une augmentation du NPQ. Les plantes qui présentaient 10% d'activité GOX dans les feuilles par rapport au contrôle montraient un phénotype photorespiratoire dans l'air, qui était absent en cultivant les plantes en conditions de fort CO<sub>2</sub> (Xu *et al.*, 2009). Elles accumulaient aussi 100 fois plus de glycolate dans l'air et elles montraient une diminution de l'état d'activation de la RuBisCO, associée à une plus faible activité carboxylase initiale de la RuBisCO dans ces plantes (Xu *et al.*, 2009). L'expression de certains gènes photorespiratoires (HPR, SGAT et GDC-H) était diminuée dans ces mutants (Xu *et al.*, 2009).

D'autres mutants ont été obtenus, chez le riz, par ARN interférence dirigé cette fois-ci contre le gène *OsGLO4*. Ils avaient environ 20% d'activité GOX foliaire restante par rapport au contrôle et une réduction de l'assimilation de CO<sub>2</sub> d'un facteur quatre (Lu *et al.*, 2013). Comme dans le cas précédent, cette inhibition était associée à une diminution de l'état d'activation de la RuBisCO. Les feuilles de ces mutants accumulaient fortement du glyoxylate, en corrélation avec la baisse de la photosynthèse et ceci a été interprété comme étant le facteur à l'origine de l'inhibition de l'activité RuBisCO (Lu *et al.*, 2013).

Chez le maïs, une plante en C<sub>4</sub>, où l'intensité photorespiratoire est environ 4 fois plus faible que chez une plante en C<sub>3</sub> (Laisk et Edwards, 1998), le mutant *go1*, généré par déplacement d'éléments transposables dans le génome, n'était pas viable dans l'air quand les feuilles contenaient 5 à 10% d'activité GOX foliaire par rapport au contrôle (Zelicht *et al.*, 2009). Cependant, ce phénotype n'était pas observé en conditions de fort CO<sub>2</sub>. Suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, les feuilles de ce mutant accumulaient 7 à 11 fois plus de glycolate par rapport aux plantes sauvages, tandis que l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> était réduite de moitié. Après 5 jours de transfert, les feuilles devenaient jaunes et nécrotiques, puis la plante mourrait au bout de 15 jours. Ces résultats inattendus soulignent l'importance de maintenir un cycle photorespiratoire tant pour les plantes en C<sub>3</sub> que pour les plantes en C<sub>4</sub>.

L'analyse de l'ensemble des mutants GOX chez les plantes soit en C<sub>3</sub> soit en C<sub>4</sub> montre que la limitation de l'activité photorespiratoire par le biais d'une réduction de la quantité de GOX induit une inhibition de l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> dans l'air, *via* la diminution de l'état d'activation de la RuBisCO et donc de son activité enzymatique. Ceci impacte négativement sur le transfert d'électrons photosynthétique, et sur le long terme, la plante présente alors un retard de croissance.

#### 4) Rôle de la GOX dans la réponse aux stress biotiques

Dans le cadre des stress biotiques, c'est-à-dire l'attaque de la plante par des pathogènes (bactéries, champignons, herbivores...), la plante possède un système de défense à plusieurs niveaux, conférant une immunité innée ou acquise (modèle du zigzag) (voir Jones et Dangl, 2006).

L'immunité innée correspond à la mise en place des défenses basales de la plante, *via* l'activation des défenses par la reconnaissance des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns ; protéines constitutrices des pathogènes) et DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns ; produits de dégradation des parois végétales) par des récepteurs membranaires LRR-K (Leucine Rich Repeat-kinase) (Newmann *et al.*, 2013). Cette reconnaissance engendre une cascade de signalisation par phosphorylation (souvent des MAP kinases) afin d'activer la transcription des gènes de défense, mais aussi un burst oxydatif se traduisant par la production massive de ROS, essentiellement par la NADPH oxydase, (*RBOH-D*) qui produit l'ion superoxyde dans l'apoplaste, qui est par la suite dismuté en  $H_2O_2$  par la superoxyde dismutase (Torres *et al.*, 2006).

L'immunité acquise correspond à la mise en place des défenses spécifiques de la plante vis-à-vis du pathogène (relation gène à gène (Flor H. H., 1971)), *via* l'activation des défenses par la reconnaissance de facteurs d'avirulence, sécrétés spécifiquement par les pathogènes, par des protéines R (Nucleotide Binding Site-LRR (NBS-LRR)). Lorsque l'interaction plante-pathogène est compatible, la plante possède le ou les gènes de résistances spécifiques aux facteurs d'avirulence, et il y a alors déclenchement d'une réaction hypersensible (HR) au niveau du site d'infection conduisant à de la mort cellulaire chez la plante. Ce mécanisme de défense met en jeu des hormones telles que l'acide salicylique, l'acide jasmonique, et l'éthylène. La photorespiration pourrait jouer un rôle dans la réponse des plantes aux attaques pathogènes à deux niveaux : lors de la reconnaissance des DAMPs et PAMPs, et lors de la reconnaissance des facteurs d'avirulence.

Dans la littérature, il existe plusieurs études proposant un rôle de la GOX dans la réponse aux pathogènes soit lors d'une interaction hôte soit lors d'une interaction non-hôte, et ceci chez différentes espèces.

Chez *N. benthamiana*, un criblage basé sur le VIGS (« Virus Induced Gene Silencing ») a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans la résistance non-hôte contre *P. syringae* pv tabaci, dont l'homologue de GOX1 d'*A. thaliana* (Rojas *et al.*, 2012). Les mutants VIGS contre la GOX de *N. benthamiana* et les simples mutants pour les cinq gènes GOX chez *A. thaliana* montrent une réduction de l'activité GOX et cela mène à une plus faible résistance non-hôte au pathogène *P. syringae* chez ces plantes, associé à une augmentation de la multiplication bactérienne trois jours après l'inoculation des feuilles. De plus, les feuilles des simples mutants *gox* d'*A. thaliana* accumulent moins d' $H_2O_2$  et d'électrolytes que le contrôle après 24h d'inoculation, tandis que la déposition de callose était réduite 48 h après inoculation. Ceci suggère que l'activité de la GOX est requise pour la résistance contre les pathogènes non-hôte (Rojas *et al.*, 2012). Les doubles mutants *gox1xhaox1*, *gox1xgox3* et *haox1xgox3* montrent une plus grande multiplication bactérienne trois jours après inoculation par rapport aux simples mutants *gox1*, *gox3* et *haox1*, démontrant un effet additif de l' $H_2O_2$  produit par la GOX dans la réponse aux pathogènes. Dans un fond génétique permettant l'extinction de l'expression du gène *RBOHD*, codant la NADPH oxydase et dont l'activité est induite par d'une attaque pathogène, une mutation dans l'un des cinq gènes *GOX* d'*A. thaliana* provoquait toujours une baisse de la résistance non-hôte en réponse à la bactérie *P. syringae* (Rojas *et al.*, 2012 ; Rojas & Mysore, 2012). Ceci implique que le rôle de l' $H_2O_2$  produit par la GOX lors d'une attaque pathogène serait indépendant de la NADPH oxydase. Enfin, l'expression des gènes *GOX3*, *HAOX1* et *HAOX2* est fortement induite en réponse à une attaque d'un pathogène non-hôte (Rojas *et al.*, 2012). Il a été montré que l'expression de gènes des voies de défenses relatives à l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène était fortement réduite chez les simples mutants *gox3* et *haox2* 24 h après inoculation de *P. syringae* par rapport au contrôle. Ceci suggère un rôle majeur de ces gènes dans l'activation des cascades de défenses des plantes pendant une interaction non-hôte (Rojas *et al.*, 2012).

Chez le tabac, la résistance à la toxine fongique victorine est liée à l'activité de la protéine LOV1 (une protéine NBS-LRR). Un criblage par VIGS, chez *N. benthamiana*, pour trouver des gènes nécessaires pour la mise en place de la mort cellulaire induite par la victorine et dépendante de LOV1 a pu identifier plusieurs gènes « photorespiratoires » dont la *GOX* (Gilbert et Wholpert, 2013).

Lors d'une récente thèse, un crible de mutants supprimeurs de la toxicité de l'effecteur DspA/E a été effectué sur une lignée transgénique d'*Arabidopsis* exprimant le facteur

d'avirulence DspA de la bactérie *Erwinia amylovora* dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la toxicité de cette protéine. Ce crible a pu mettre en évidence plusieurs lignées suppresseurs qui portaient des mutations ponctuelles dans le gène *GOX2*. En parallèle, des analyses fonctionnelles sur le mutant *gox2-2* ont permis de montrer que le gène *GOX2* était un régulateur positif des réponses de défense d'*A. thaliana* après infection par *E. amylovora* (Launay, 2014). Ceci démontre un rôle important pour le gène *GOX2* dans la toxicité de cet effecteur chez *Arabidopsis*.

Chez le riz, deux gènes *GLO1* et *GLO4* sont très fortement exprimés dans les feuilles (Zhang *et al.*, 2012). L'isoforme *GLO1* peut interagir avec une protéine glutarédoxine, qui interagit avec les facteurs de transcriptions TGA pouvant réguler les réponses de défenses dans le cadre de l'immunité spécifique acquise *via NPR1* (Seo *et al.*, 2011). Des lignées mutantes obtenues par ARN interférence inducible dirigé contre *OsGLO1* chez le riz présentent des symptômes de mort cellulaire, ainsi qu'un retard de croissance dans l'air, reflétant fortement un phénotype photorespiratoire (Chern *et al.*, 2013). Ces lignées montrent une plus grande résistance face à la bactérie hôte *X. oryzae* pv *oryzae* comparée aux plantes de contrôle, et ceci est associé à une forte accumulation de transcrits de gènes de défense (*PR1*, *WK45*) (Chern *et al.*, 2013). Ceci implique que le rôle de la GOX dans la mise en place des réactions de défense contre les attaques de pathogènes diffère selon l'espèce, et n'est donc pas extensible à l'ensemble des plantes en C<sub>3</sub> (Rojas *et al.*, 2012; Chern *et al.*, 2013). Toujours chez le riz, la GOX peut interagir *in vivo* avec la protéine P8 (protéine de la capsid du virus du riz nain), entraînant la relocalisation de P8 dans le peroxysome (Zhou *et al.*, 2007). Or les peroxysomes servent de sites de réplication pour de nombreux virus. Cette interaction pourrait donc jouer un rôle déterminant dans le degré de virulence de ce pathogène (Zhou *et al.*, 2007).

Chez la vigne (*Vitis vinifera*), des plantes infectées par une bactérie induisant la flavescence dorée peuvent spontanément guérir. Ce phénomène s'accompagne d'une forte accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ainsi qu'une forte augmentation de la quantité de transcrits de gènes impliqués dans le système antioxydant, et notamment la GOX (4 à 5 fois plus de transcrits par rapport au contrôle) (Gambino *et al.*, 2013).

Un rôle dans la défense des plantes face aux attaques de pathogènes a été mis en évidence pour d'autres enzymes photorespiratoires :



- Chez le soja, HPR interagit spécifiquement avec un récepteur d'un éliciteur bactérien (syringolide), et le glycérate, produit par l'enzyme HPR, abolirait la réponse HR causée par cet éliciteur (Okinaka *et al.*, 2002).
- L'activité des protéines P et H du complexe GDC est inhibée en présence de victorine, une toxine fongique hôte-spécifique. Il s'avère que la victorine peut se fixer sur ces protéines (Navarre et Wolpert, 1995).
- Chez le tabac, la réponse de mort cellulaire et la fuite d'électrolytes provoquées par la toxine fongique victorine sont fortement diminuées lorsque l'expression de certains gènes photorespiratoires est éteinte (gènes codant la protéine T du complexe GDC, la protéine P du complexe GDC et la glutamine synthase) (Gilbert et Wholpert, 2013).

## VI. La glutamate:glyoxylate aminotransférase

La glutamate:glyoxylate aminotransférase (EC 2.6.1.4 ; GGT) catalyse le transfert d'un groupement amide du glutamate vers le glyoxylate pour former une molécule de glycine, et une molécule de 2-OG. Cependant, il a déjà été montré *in vitro* que cette enzyme pouvait catalyser d'autres réactions. En effet, les protéines recombinantes GGT1 et GGT2 d'*A. thaliana* (sous-unités de 53 kDa), ainsi que des protéines GGT purifiées à partir de feuilles d'épinard montrent aussi une activité alanine:2-OG aminotransférase, et glutamate:pyruvate aminotransférase (Liepman et Olsen, 2003). Cependant l'activité la plus forte mesurée correspond à une activité alanine:2-oxoglutarate aminotransférase pour les protéines GGT1 et GGT2. Ces enzymes présentent un  $K_m$  pour le glyoxylate, le pyruvate et le 2-OG relativement similaire autour de 200 à 400  $\mu$ M, ainsi qu'un  $K_m$  pour le glutamate et l'alanine entre 3 et 7 mM (Liepman et Olsen, 2003). Chez le riz, la protéine codée par le gène Os07g018300 (homologue aux gènes *GGT* d'*A. thaliana*) possède aussi les activités glutamate:glyoxylate aminotransférase, alanine:glyoxylate aminotransférase, glutamate:pyruvate aminotransférase, et alanine:2-OG aminotransférase. Les  $V_{max}$  et  $k_{cat}$  étaient très similaires pour les activités glutamate:glyoxylate aminotransférase, alanine:glyoxylate aminotransférase et alanine:2-OG aminotransférase (Zhang *et al.*, 2015). L'enzyme recombinante présente les  $K_m$  suivants: 1,57 mM pour le glutamate, 2,27 à 2,95 mM pour l'alanine, 0,21 à 0,32 mM pour le glyoxylate et 0,55 mM pour le 2-OG (Zhang *et al.*, 2015).



Les protéines GGT chez *A. thaliana*, ayant une forte homologie de séquences avec des alanine:2-OG aminotransférases (AOAT) d'autres organismes, elles ont été identifiées comme des AOAT (AOAT1 (At1g23310) et AOAT2 (At1g70580)). Par la suite, des expériences de fusion de protéine à la GFP ont montré que l'enzyme AOAT1 était spécifiquement adressée aux peroxysomes des cellules BY2 de tabac (Igarashi *et al.*, 2003). En effet, elle possède un signal typique d'adressage peroxysomal en position C-terminal (tripeptide SKM (Ma & Reumann, 2008)), tout comme AOAT2, suggérant qu'AOAT2 serait aussi adressé aux peroxysomes (Igarashi *et al.*, 2003). L'analyse du mutant *aoat1-1* a permis d'identifier AOAT1 comme une GGT peroxysomale impliquée dans la photorespiration (et donc équivalente à GGT1 d'*Arabidopsis*), et par extension, AOAT2 a été identifiée comme GGT2 (Igarashi *et al.*, 2003).

La construction de plantes transgéniques avec le gène *UIDA* sous le contrôle du promoteur des gènes *GGT1* et *GGT2* chez *A. thaliana* a montré que ces gènes étaient effectivement fortement exprimés dans les feuilles de plantules. Le gène *GGT1* était aussi très fortement exprimé dans les racines, proposant ainsi un rôle pour cette enzyme dans les tissus non-photosynthétiques et/ou à l'obscurité (Igarashi *et al.*, 2006). Des expériences de RT-qPCR sur des plantes d'*A. thaliana* Col-0 ont montré que le gène *GGT1* (*AOAT1* dans ce travail) était 50 fois plus exprimé que le gène *GGT2* (*AOAT2* dans ce travail) dans les feuilles, et 15 fois plus exprimé dans les fleurs. Ceci confirme le rôle majeur de la protéine GGT1 dans la photorespiration par rapport à GGT2 (Igarashi *et al.*, 2003).

Un mutant « knock-out » *aoat1-1* pour le gène *GGT1* (insertion dans le 6<sup>ème</sup> exon) chez *A. thaliana* présente un léger retard de croissance *in vitro* dans l'air après 3 semaines (phénotype photorespiratoire de type III), qui est absent lorsque les plantes se développent en conditions de fort CO<sub>2</sub>. Ce phénotype était absent dans l'air sous une intensité lumineuse de 30  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , et partiellement absent à 70  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  en présence de 3% de sucrose dans le milieu (Igarashi *et al.*, 2003). A l'époque, ces données démontraient déjà un rôle d'AOAT1 (GGT1) dans la photorespiration. Le mutant présentait de très faibles activités glutamate:glyoxylate aminotransférase et alanine:glyoxylate aminotransférase foliaires dans l'air (15% du contrôle) et des activités alanine:2-OG aminotransférase et glutamate:pyruvate aminotransférase diminuées (environ 60% du contrôle) (Igarashi *et al.*, 2003). Ces activités sont en accord avec les activités aminotransférase mesurées *in vitro* sur la GGT1 recombinante (Liepman et Olsen, 2003). Après 8 h de transfert de l'obscurité à la

lumière sur des plantes ayant eu deux semaines de croissance à  $70 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  sur milieu MS1/2 + 1% sucrose, le mutant *aoat1-1* accumulait deux fois moins de glycine et trois fois moins de sérine dans ses feuilles par rapport au contrôle. Aussi, la quantité de glutamine, de glutamate et d'asparagine augmentaient, tandis que celle d'asparagine diminuait. Ceci suggèrait que la protéine GGT1 jouait aussi un rôle dans l'homéostasie de certains acides aminés (Igarashi *et al.*, 2003). De façon intéressante, des mutants cultivés pendant 2 semaines sur milieu MS + 1% sucrose et  $150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  d'intensité lumineuse présentaient les mêmes changements d'acides aminés par rapport aux mêmes plantes cultivées à  $30 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Igarashi *et al.*, 2003). Ceci suggèrait que le rôle de GGT1 dans l'homéostasie de certains acides aminés était indépendant de l'intensité lumineuse.

Dans le but de mieux comprendre le rôle de GGT dans la régulation du métabolisme des acides aminés, des lignées surexprimants le gène *GGT1* sous le contrôle de son propre promoteur (par l'insertion d'un fragment génomique du gène *GGT1*) ont été générées chez *A. thaliana*. Ces lignées montraient une corrélation positive entre l'augmentation de l'activité GGT, la quantité de transcrits GGT1 et la quantité de sérine, de glycine et de citrulline dans les feuilles à la lumière (Igarashi *et al.*, 2006). Elles accumulaient plus de sérine et moins des autres acides aminés par rapport au contrôle et au mutant *aoat1-1*, démontrant que l'augmentation de la quantité de sérine n'était pas liée à une augmentation de l'assimilation d'azote dans les acides aminés. Des lignées transgéniques similaires ont été produites chez le riz avec le gène *GGT1* d'*A. thaliana* sous le contrôle d'un promoteur *CAB*, induisant ainsi fortement l'expression de gènes dans les tissus photosynthétiques. Les feuilles de ces plantes accumulaient plus de transcrits *GGT1* et de sérine, impliquant donc un rôle équivalent pour l'enzyme GGT dans l'homéostasie de la sérine chez les plantes mono et dicotylédones (Igarashi *et al.*, 2006). En 2007, un lien a été établi entre l'activité de l'enzyme GGT1, la signalisation par l'acide abscissique (ABA) et la réponse aux stress puisqu'un autre mutant *ggt1* montrait une plus faible induction de l'expression du gène *RD29A* (gène régulé lors de stress au froid, salin, déshydratation, ou bien en réponse à l'ajout d'ABA exogène) en présence d'ABA (dès 1h de traitement) ou lors d'un stress salin (après 5h de traitement à 300 mM NaCl) (Verslues *et al.*, 2007). Ces plantes accumulaient de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  uniquement à la lumière. Les auteurs ont proposé que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  était d'origine photorespiratoire. Cependant, aucune hypothèse n'a été avancée pour expliquer l'augmentation de la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  photorespiratoire chez ce mutant par rapport au contrôle. Le mutant accumulait aussi de la proline dans des conditions normales, et en présence d'ABA ou de NaCl, bien qu'il contienne

moins d'ABA. Ces symptômes ont aussi été observés pour le mutant *ndpk2* (mutant pour l'enzyme nucléoside diphosphokinase, ayant un rôle clé dans la biosynthèse de l'ABA). Il a été conclu que l'augmentation de la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la lumière provoquait une augmentation de la quantité de proline, dépendante de l'ABA, et responsable de la réponse aux différents stress chez ce mutant (Verslues *et al.*, 2007).

## VII. Objectifs de mes travaux de thèse

La photorespiration est associée à une perte partielle de carbone et d'azote au cours de son cycle. Par conséquent, elle représente une cible pour essayer d'augmenter la production de biomasse par les plantes. Cependant, cette voie est fortement connectée au métabolisme primaire des feuilles de la plante, et le fort phénotype dans l'air qui est associé aux mutants photorespiratoires montre qu'elle est importante pour la croissance et le bon développement des plantes. Les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire ne sont pas encore très bien caractérisées à l'échelle de la feuille, de même que les propriétés biochimiques des enzymes photorespiratoires. Les objectifs majeurs de cette thèse étaient de :

1. Caractériser et comparer les propriétés enzymatiques de la GOX photorespiratoire d'une plante en C<sub>3</sub> (*Arabidopsis thaliana*) et en C<sub>4</sub> (*Zea mays*).
2. Mieux comprendre les interactions entre la photorespiration et la photosynthèse, le cycle de Krebs et le métabolisme des acides aminés.

Dans la littérature, des différences de K<sub>m</sub> pour le glycolate pour des GOX de plantes en C<sub>3</sub> et en C<sub>4</sub> sont observables, et elles pourraient refléter les différences d'intensité de flux photorespiratoire entre ces deux types de plantes. Mais ces comparaisons de K<sub>m</sub> ont été faites avec les données issues d'extraits différents (protéines recombinantes, protéines purifiées à partir de feuilles ou bien seulement partiellement purifiées).

- Les paramètres cinétiques de GOX recombinantes d'*A. thaliana* (plante en C<sub>3</sub>) et de maïs (plante en C<sub>4</sub>) ont donc été mesurés *in vitro*, afin de pouvoir les comparer équitablement. Le mécanisme réactionnel de la GOX n'est pas complètement connu, avec deux mécanismes possibles d'abstraction du premier proton sur le glycolate aboutissant à deux états de transitions énergétiquement différents: le carbanion ou le transfert d'hydrure. Les paramètres cinétiques des GOX avec du glycolate marqué au deutérium (<sup>2</sup>H) ainsi que leur préférence pour le glycolate marqué

naturellement au  $^{13}\text{C}$  (discrimination isotopique) ont été mesurés afin de pouvoir argumenter en faveur d'un des deux états de transition possible.

Pour mieux appréhender les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire foliaire, nous avons caractérisé des mutants pour deux enzymes photorespiratoires chez la plante modèle *A. thaliana*. Nous nous sommes intéressés à l'enzyme GOX, car aucun mutant GOX chez *A. thaliana* ayant un phénotype photorespiratoire n'avait été décrit auparavant dans la littérature et à l'enzyme GGT, qui représente un lien direct entre la photorespiration, le cycle GS/GOGAT (car elle a besoin de glutamate), ainsi que la biosynthèse d'autres acides aminés :

- Deux mutants d'insertion ADN-T pour le gène *GGT1* ont été caractérisés à partir de plantes soit mises en culture uniquement dans l'air, soit mises en culture en fort  $\text{CO}_2$  et après leur transfert dans l'air. L'étude s'est focalisée plus particulièrement sur la mise en place de l'inhibition de la photosynthèse chez ces mutants. Les mesures de quantités de métabolites (par GS-MS et HPLC), d'échanges gazeux, de paramètres de fluorescence chlorophyllienne, ainsi que les quantités, les activités et l'état d'activation de la RuBisCO ont permis de proposer un modèle pour expliquer l'apparition du phénotype photorespiratoire dans l'air chez ces mutants. Celui-ci met en avant les interactions entre les métabolismes carbonés et azotés chez les plantes.
- Comme les simples mutants pour les gènes *GOX1* et *GOX2* ne montraient pas de phénotype photorespiratoire dans l'air, nous avons construit une lignée ARN interférence permettant d'éteindre l'expression des deux gènes (*amiRgox1/2*), qui par la suite a pu être complétée par le gène *GO1* de *Z. mays*. Ces deux lignées ont été caractérisées uniquement après un transfert de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air, et des marquages au  $^{13}\text{CO}_2$  ont été réalisés afin de suivre les changements d'allocation du carbone par résonance magnétique nucléaire (RMN) en réponse à l'apparition du phénotype photorespiratoire chez la lignée *amiRgox1/2*. En parallèle, les mesures de quantités de métabolites (par GS-MS, HPLC), d'échanges gazeux, de paramètres de fluorescence chlorophyllienne ainsi que les quantités de chlorophylles et de RuBisCO ont été réalisées. Les résultats démontraient que l'inhibition de la photorespiration diminuait l'allocation de carbone vers les sucres, le cycle de Krebs et les acides aminés, probablement à cause de l'interruption du recyclage du carbone par la

photorespiration. En conséquence, un phénotype photorespiratoire apparaissait chez la lignée *amiRgox1/2* après transfert, ainsi que des symptômes sur les vieilles feuilles qui ressemblent à ceux observés lors de la sénescence.

# Résultats

## Résumé de l'article I

Chez les mammifères, la GOX est impliquée dans la voie de biosynthèse de la glycine dans les peroxysomes de reins, de foie et de pancréas, mais aussi dans la production d'oxalate. Cette enzyme représente donc une cible pour traiter l'hyperoxalurie (maladie génétique affectant l'alanine:glyoxylate aminotransférase qui entraîne la formation de calculs rénaux) par des inhibiteurs pharmacologiques contre sa propre activité. Chez les plantes, la GOX est importante pour le recyclage du carbone du 2-PG par la photorespiration. Malgré des similitudes entre les GOX de plantes en C<sub>3</sub> et en C<sub>4</sub>, les données de la littérature montrent un K<sub>m</sub> pour le glycolate plus faible pour les GOX de plantes en C<sub>4</sub> par rapport aux plantes en C<sub>3</sub>. Si ces différences biochimiques sont réelles, elles pourraient se traduire sur la vitesse des étapes élémentaires du mécanisme réactionnel. Dans ce cas, la connaissance de l'état de transition ainsi que de l'importance des différentes étapes dans le mécanisme pour chacune des GOX pourra servir à cribler des inhibiteurs spécifiques de plantes en C<sub>3</sub> et/ou en C<sub>4</sub>. Ces inhibiteurs pourraient, par la suite, être valorisés sous forme d'herbicides spécifiques de certains types de plantes.

La réaction enzymatique de la GOX procède selon un mécanisme en ping-pong avec une première demi-réaction réductive, où deux protons sont extraits du glycolate, afin de former du glyoxylate et du FMN réduit, et une deuxième demi-réaction oxydative, où le FMN est réoxydé par une molécule d'O<sub>2</sub>, afin de régénérer son état redox initial, formant ainsi une molécule d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (voir Macheroux *et al.*, 1991). Le mécanisme d'abstraction des deux protons est sujet à un débat, avec deux scénarios possibles qui aboutissent à la formation de deux états de transitions différents:

- L'attaque du proton situé sur le C-2 du glycolate qui va former un carbanion (état de transition très instable).
- L'attaque du proton situé sur le groupement hydroxyle, qui peut alors se faire de façon concerté avec l'attaque du proton du C-2 du glycolate, aboutissant à un transfert d'hydrure (état de transition plus stable).

Afin d'éclaircir la question de l'état de transition du mécanisme réactionnel de la GOX et de vérifier les possibles différences biochimiques entre les GOX de plantes en C<sub>3</sub> et en C<sub>4</sub>, nous avons analysé les paramètres cinétiques de GOX recombinantes purifiées d'*Arabidopsis thaliana* (plante en C<sub>3</sub>) et de *Zea mays* (plante en C<sub>4</sub>). Ce choix présente l'avantage

de pouvoir comparer les GOX de plantes en C<sub>3</sub> et en C<sub>4</sub> sur un pied d'égalité (même pureté, même protocole de purification) car dans la littérature, les données comparées provenaient d'extraits différents (protéines purifiées/partiellement purifiées à partir de feuilles, protéines recombinantes produites chez des bactéries et des levures). Cependant, cette méthode fait abstraction des possibles modifications post-traductionnelles *in planta*, ainsi que de la formation de GOX hétéromérique, qui pourraient affecter les paramètres cinétiques des enzymes. De même, la présence d'une étiquette histidine sur la protéine recombinante pourrait modifier aussi ces paramètres. La réaction de la GOX impliquant un remaniement de protons, nous avons mesuré et comparé les effets isotopiques de ces enzymes en utilisant du glycolate marqué ou non au deutérium dans un solvant deutéré ou non-deutéré. Pour vérifier l'importance de la liaison C-2-H du glycolate au cours de la catalyse, l'effet isotopique <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C a aussi été mesuré en utilisant l'abondance naturelle du <sup>13</sup>C dans le glycolate marqué ou non au deutérium. Ceci a nécessité la mise au point technique de la LC-c-IRMS (chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à ratio isotopique), qui a été réalisée avec l'aide de Caroline Mauve.

Les résultats montrent que :

- Les effets isotopiques hydrogène/deutérium sont répartis sur plusieurs étapes élémentaires et suggèrent donc que la déprotonation du glycolate serait seulement partiellement limitante pour le mécanisme.
- Le calcul du facteur d'engagement de la réaction, à partir des effets isotopiques mesurés, réfute la possibilité d'un mécanisme de carbanion et par conséquent cela propose un mécanisme de transfert d'hydrure.
- Les GOX de plantes en C<sub>3</sub> et en C<sub>4</sub> n'ont pas de différences significatives de paramètres cinétiques et de mécanisme réactionnel *in vitro*.



## **Article I.**

**Le mécanisme réactionnel des GOX de plantes opère selon un transfert d'hydrure**

# Experimental Evidence for a Hydride Transfer Mechanism in Plant Glycolate Oxidase Catalysis\*

Received for publication, October 13, 2014, and in revised form, November 21, 2014. Published, JBC Papers in Press, November 21, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.618629

Younès Dello <sup>†1</sup>, Caroline Mauve <sup>‡5</sup>, Edouard Boex-Fontvieille <sup>‡</sup>, Valérie Flesch <sup>‡</sup>, Mathieu Jossier <sup>‡</sup>, Guillaume Tcherkez <sup>‡§¶</sup>, and Michael Hodges <sup>‡2</sup>

From the <sup>†</sup>Institut de Biologie des Plantes, CNRS UMR8618, Saclay Plant Sciences, Bâtiment 630, Université Paris Sud, 91405 Orsay Cedex, France, <sup>‡</sup>Plateforme Métabolisme-Métabolome, Saclay Plant Sciences, Institut de Biologie des Plantes, Bâtiment 630, 91405 Orsay Cedex, France, and <sup>¶</sup>Institut Universitaire de France, 103 Boulevard Saint-Michel, 75005 Paris, France

**Background:** Uncertainty remains about the nature of transition states along the reductive half-reaction of glycolate oxidase.

**Results:** Deuterated glycolate and solvent slow down plant glycolate oxidase catalysis to a modest extent.

**Conclusion:** Isotope effects support a hydride transfer mechanism and indicate glycolate deprotonation to be only partially rate-limiting.

**Significance:** Understanding the catalytic mechanism of the enzyme is crucial for designing drugs/herbicides to inhibit its activity.

In plants, glycolate oxidase is involved in the photorespiratory cycle, one of the major fluxes at the global scale. To clarify both the nature of the mechanism and possible differences in glycolate oxidase enzyme chemistry from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species, we analyzed kinetic parameters of purified recombinant C<sub>3</sub> (*Arabidopsis thaliana*) and C<sub>4</sub> (*Zea mays*) plant enzymes and compared isotope effects using natural and deuterated glycolate in either natural or deuterated solvent. The <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C isotope effect was also investigated for each plant glycolate oxidase protein by measuring the <sup>13</sup>C natural abundance in glycolate using natural or deuterated glycolate as a substrate. Our results suggest that several elemental steps were associated with an hydrogen/deuterium isotope effect and that glycolate  $\alpha$ -deprotonation itself was only partially rate-limiting. Calculations of commitment factors from observed kinetic isotope effect values support a hydride transfer mechanism. No significant differences were seen between C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> enzymes.

Glycolate oxidase (EC 1.1.3.15; glycolate:oxygen oxidoreductase; GOX<sup>3</sup>) is a peroxisomal enzyme that converts glycolate into glyoxylate with the production of hydrogen peroxide from O<sub>2</sub> via a flavin mononucleotide (FMN)-mediated reaction. This enzyme is a member of the  $\alpha$ -hydroxy-acid oxidase superfamily, which includes short-chain and long-chain hydroxy-acid oxidases, lactate oxidase, and the flavin-binding domain of yeast flavocytochrome *b*<sub>2</sub> (1). It appears that plant and animal

GOXs (short-chain  $\alpha$ -hydroxy-acid oxidases) arose from a common eukaryotic GOX ancestor that originated from a bacterial lactate oxidase (2). In mammals, GOX is responsible for the production of oxalate (3), and therefore it is a potential site for therapeutic agents to treat primary hyperoxaluria (4), a genetic disorder that leads to large kidney stones due to calcium oxalate deposition. In plants, GOX is involved in the photorespiratory cycle, a metabolic pathway that recycles phosphoglycolate from ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (EC 4.1.1.39) (Rubisco)-catalyzed oxygenation. Photorespiratory glycolate oxidation by terrestrial vegetation represents a flux of nearly 3 Pmol/year and is thus one of the major fluxes at the global scale (5).

To date, the best characterized GOX in terms of structure, kinetics, and biochemical properties is from spinach leaves (*Spinacia oleracea*). The three-dimensional structure of spinach GOX has identified Ser<sup>106</sup>, Tyr<sup>129</sup>, Thr<sup>155</sup>, and Lys<sup>230</sup> as important residues in the stabilization of the FMN cofactor, whereas Tyr<sup>24</sup>, Tyr<sup>129</sup>, and Arg<sup>257</sup> are involved in substrate binding. His<sup>254</sup> is essential for catalysis as it is involved in the proton abstraction from the glycolate C2 atom (6). This role was found in other  $\alpha$ -hydroxy-acid oxidase superfamily members because mutation of the equivalent His residue (H373Q for flavocytochrome *b*<sub>2</sub> and H290Q for lactate oxidase) led to reduced activities and substrate *K<sub>m</sub>* values or inactive recombinant proteins (7, 8). The recent structure of human liver GOX has indicated the conservation of the active site residues between plant and animal enzymes (9). A ping-pong bi-bi reaction mechanism composed of two half-reactions has been proposed for GOX. In the reductive half-reaction, after the reversible formation of the Michaelis complex between the enzyme and glycolate, protons are abstracted from glycolate C2 and accepted by the FMN (Fig. 1). The complex is then dissociated, and glyoxylate is released. Stopped-flow studies using recombinant GOX produced in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) suggested the FMN reduction step of GOX catalysis to be rate-limiting (10). In the oxidative half-reaction, FMN is reoxidized by O<sub>2</sub> to produce hydrogen per-

\* This work was supported in part by French State Grants ANR-10-LABX-0040-SPS (managed by the French National Research Agency under the Investments for the Future Program ANR-11-IDEX-0003-02) and ANR JC 12-0001-01 (to G. T.), the CNRS, and the Université Paris Sud.

<sup>1</sup> Supported by a Ph.D. grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-169153335; Fax: 33-169153424; E-mail: michael.hodges@u-psud.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: GOX, glycolate oxidase; Rubisco, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; KIE, kinetic isotope effect; SIE, solvent isotope effect.

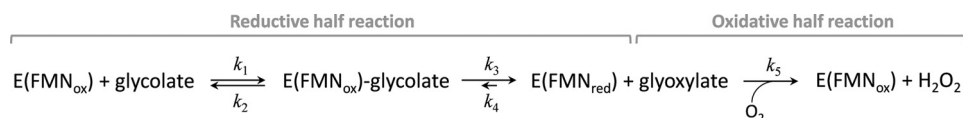


FIGURE 1. **Formal mechanism of the GOX-catalyzed reaction.** In the reductive half-reaction, after the formation of the Michaelis complex GOX-glycolate, protons are abstracted from glycolate and accepted by the FMN. The enzyme-substrate complex is dissociated, and glyoxylate is released. In the oxidative half-reaction, FMN is reoxidized by O<sub>2</sub> to produce hydrogen peroxide. The notation for rate constants (*k*<sub>1</sub>, *k*<sub>2</sub>, *k*<sub>3</sub>, *k*<sub>4</sub>, and *k*<sub>5</sub>) follows that of Macheroux *et al.* (10).

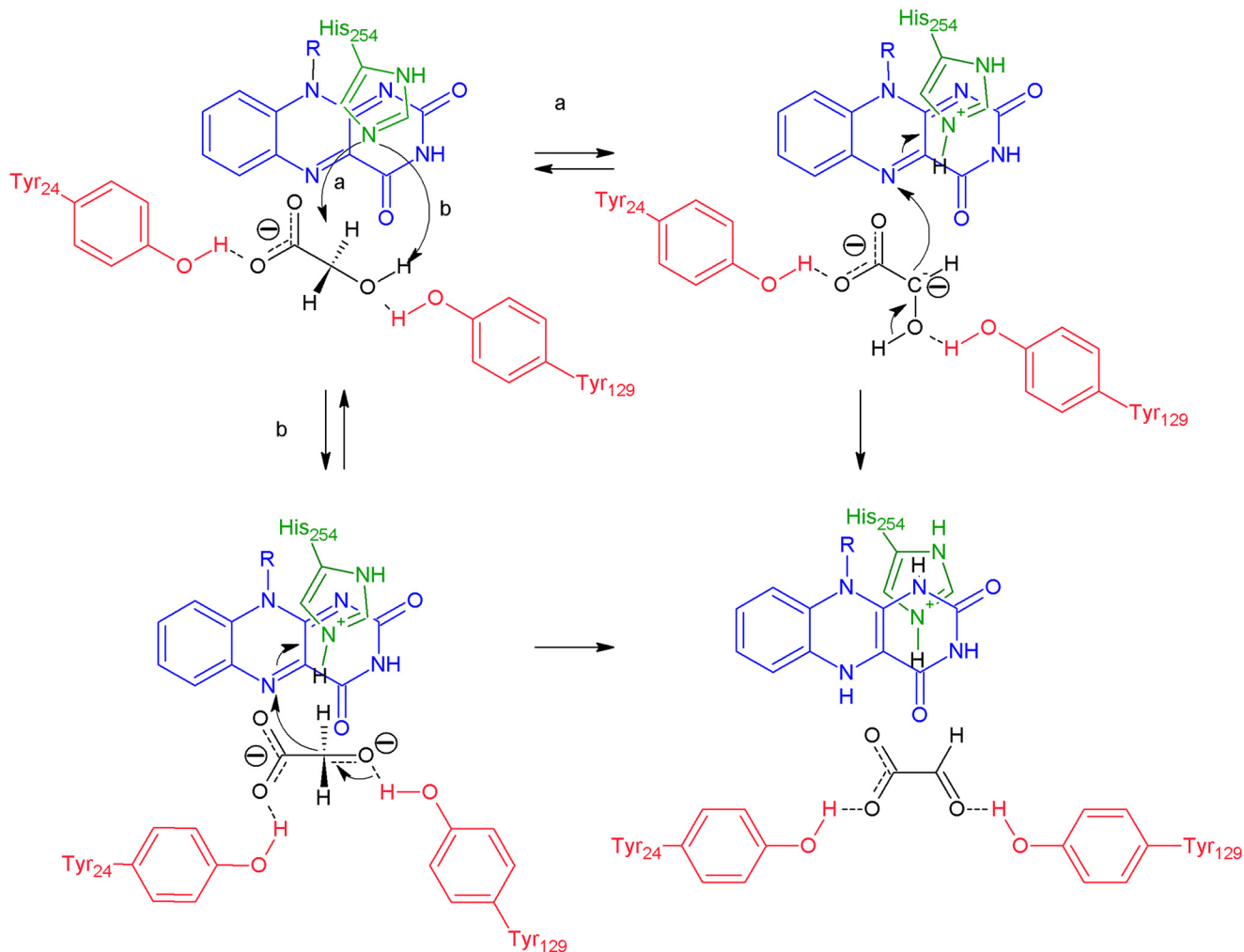


FIGURE 2. **Possible mechanisms of glycolate deprotonation catalyzed by GOX.** *a*, carbanion-based stepwise mechanism. *b*, concerted hydride transfer. The interactions within the active site between glycolate (black), Tyr<sup>24</sup> and Tyr<sup>129</sup> (red), His<sup>254</sup> (green), and the isoalloxazine ring of FMN (blue) are shown, and additional interactions with other residues are omitted for clarity. Note that the two mechanisms presented differ by the nature of the first proton being attacked by His<sup>254</sup>. In *b*, proton abstraction from O<sub>2</sub> (hydroxyl) and C2 ( $\alpha$ -proton) are shown as two separate steps, but they may occur within the same reaction elemental step (asynchronous concerted rearrangement).

oxide. Recently, new spectroscopy advances have been used to indicate that reduced FMN undergoes a two-step oxidation in recombinant human liver GOX (11).

Despite the current knowledge of the chemical basis of GOX catalysis, uncertainty remains about the nature of transition states along the reductive half-reaction. Two scenarios (see Fig. 2) are described in the literature that differ by the position of the first abstracted proton and thus the sequence of elemental steps. In the carbanion-based mechanism (Fig. 2*a*), the side chain of a crucial histidine residue (His<sup>254</sup> in spinach GOX) abstracts the  $\alpha$ -proton from the C2 atom of glycolate, leading to the formation of a negatively charged intermediate. The proton of the hydroxyl group attached to the C2 atom of glycolate is

then abstracted by the N5 of the FMN. In the hydride transfer mechanism (Fig. 2*b*), the two protons are abstracted in a concerted manner with the side chain of the His residue abstracting the proton of the hydroxyl group of glycolate, and at the same time, the  $\alpha$ -proton is transferred to the N5 atom of the FMN (see Ref. 12). Interestingly, previous studies have shown differences between the kinetic parameters of GOXs from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species. GOX from C<sub>4</sub> species appear to have a lower *K<sub>m</sub>* for glycolate (10  $\mu$ M for *Amaranthus hypochondriacus* and 23 and 65  $\mu$ M for *Zea mays* guard cells and mesophyll cells, respectively) compared with C<sub>3</sub> species (330  $\mu$ M for *Cucurbita pepo* cotyledons, 300  $\mu$ M for *Pisum sativum*, 1 mM for *S. oleracea*, and 1.9 mM for *Arabidopsis thaliana* GOX2) (13–16). These obser-

variations suggest potential differences in substrate binding and perhaps reaction velocity kinetics. Such differences would correspond to an adaptation to cellular metabolic conditions, that is the naturally lower glycolate contents in  $C_4$  plants due to the reduced photorespiration. Furthermore, it might be hypothesized that the enzyme from  $C_3$  species would have a larger  $V_{\max}$  to ensure maximal glycolate conversion at high photorespiratory rates. However, there is presently little data that compare the catalytic effectiveness of  $C_3$  and  $C_4$  enzymes, including the determination of limiting steps.

As an aid in clarifying both the nature of the mechanism and possible differences in  $C_3$  and  $C_4$  enzyme chemistry, we analyzed the kinetics of recombinant  $C_3$  and  $C_4$  enzymes using isotope effects. Kinetic parameters of purified recombinant GOX1 (At3g14420) and GOX2 (At3g14415) from *A. thaliana* (the two GOX genes highly expressed in leaves) and GO1 from *Z. mays* (the gene giving a photorespiratory phenotype when mutated (17)) were compared using natural and deuterated glycolate in either natural or deuterated solvent. The  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  isotope effect was also investigated for each plant GOX protein by measuring the  $^{13}\text{C}$  natural abundance in glycolate using natural or deuterated glycolate as a substrate. Our results suggest that several elemental steps are associated with an hydrogen/deuterium isotope effect and that glycolate  $\alpha$ -deprotonation itself is only partially rate-limiting. Calculations of commitment factors from observed kinetic isotope effect (KIE) values support a hydride transfer mechanism. No significant differences were seen between  $C_3$  and  $C_4$  enzymes.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Constructs to Express Plant GOX Proteins in *Escherichia coli* Cells**—The coding regions of AtGOX1 and ZmGO1 were PCR-amplified using different cDNA templates, gene-specific primers with added restriction enzyme sites (AtGOX1-NheI and AtGOX1-XhoI; ZmGO1-NheI and ZmGO1-XhoI), and *Taq* polymerase (Promega). Total RNA was extracted from *A. thaliana* rosette leaves using TRIzol® as in Jossier *et al.* (18). All other DNA manipulations such as plasmid isolation, *E. coli* transformation, ligations, and restriction analyses were standard techniques. The template for *Arabidopsis* GOX1 was a cDNA made from reverse transcribed RQ1 DNase-treated total RNA from rosette leaves using AtGOX1-F and AtGOX1-R primers. The template for *Z. mays* GO1 was a full-length cDNA ordered from Arizona Genomics Institute (clone ZM\_BFc0135012). The templates were diluted and used for PCR amplification. The gene-specific primers were as follows: AtGOX1-NheI, CGGCTAGCGAGATCACTAACGTTACCG; AtGOX1-XhoI, GGGCTCGAGCTATAACCTGGCTGAAGGAC; ZmGO1-NheI, CGGCTAGCGGGGAGATCACCAATGTTCATG; ZmGO1-XhoI, GGGCTCGAGCTACAAGCGCGACGGGATG; AtGOX1-F, ACACCTCGGCATATGGAGATCACTAACGTT; and AtGOX1-R, ATTTTCCCTCGAGTAACCTGGCTGAAGGACG.

Each PCR-amplified product was purified using a PCR CleanUp kit (Macherey-Nagel), cloned into the pGEMT easy vector (Promega), and sequenced (MWG Operon, Eurofins). The verified coding sequences were transferred to the pET28a expression vector (Novagen) after digestion with NheI and

XhoI restriction enzymes (Promega) and overnight ligation. All final constructs were verified by restriction analyses using purified plasmids from isolated bacterial colonies. The construct pET28a-AtGOX2 was a kind gift from Hägemann and co-workers (16). The recombinant pET28a vectors (pET28a-AtGOX1, pET28a-AtGOX2, and pET28a-ZmGO1) were used to transform *E. coli* strain BL21(DE3) by electroporation.

**Purification of Recombinant GOX**—*E. coli* BL21 cells containing pET28a-AtGOX1, pET28a-AtGOX2, or pET28a-ZmGO1 were grown in 200 ml of Luria-Bertani broth to an  $A_{600\text{ nm}}$  of 0.4 at 37 °C. GOX protein expression was induced by addition of 1 mM isopropyl  $\beta$ -1-D-thiogalactopyranoside for 20 h at 30 °C. GOX proteins were purified via their N-terminal His tag using His-Select nickel affinity resin (Sigma-Aldrich) according to Hackenberg *et al.* (16) with some modifications. Cells were harvested and resuspended in resuspension buffer consisting of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 1 M NaCl, 10 mM imidazole, 10% glycerol, 0.1 mM FMN, and a protease inhibitor mixture (Complete Mini, EDTA-free, Roche Applied Science) on ice. Bacterial cells were broken by three passages through a French press at 600 pascals. After centrifugation ( $15,500 \times g$  for 30 min at 4 °C), soluble proteins were diluted to 10 ml and incubated with continual mixing for 3 h with 1.5 ml of affinity resin at 4 °C. The resin was washed with 50 ml of resuspension buffer supplemented with 20 mM imidazole. His-tagged GOX proteins were then eluted using resuspension buffer supplemented with 250 mM imidazole. The first 0.5-ml elution fraction was disregarded because it did not contain recombinant protein, and the next 2.5 ml of 0.5-ml fractions was pooled to give the soluble GOX fraction that was immediately desalted through PD-10 columns (GE Healthcare) equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% glycerol, and 0.1 mM FMN following the manufacturer's instructions. The purity of each recombinant GOX protein was checked by SDS-PAGE (12% acrylamide) stained with Coomassie Brilliant Blue (19). Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Purified GOX was stored at 4 °C for up to 7 days without any modification in enzymatic activity. For isotopic discrimination experiments, GOX was purified as described above except that desalting was carried out in the absence of glycerol because it interfered with the HPLC separation of glycolate.

**GOX Activity Measurements**—Enzyme activity was measured in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 with different glycolate concentrations (0.1–10 mM) and 4  $\mu\text{g}$  of purified recombinant GOX by an enzyme-coupled reaction at 30 °C. Glycolate-dependent  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was quantified in the presence of 0.4 mM *o*-dianisidine and 2 units of horseradish peroxidase by measuring the  $\Delta A_{440\text{ nm}}$  using a Varian Cary 50 spectrophotometer. GOX activity assays with stable isotopes were performed using deuterium oxide (99.9 atom % D; Sigma-Aldrich), deuterium chloride (solution 35% (w/w) in  $\text{D}_2\text{O}$ , 99.9 atom % D; CDN Isotopes), 2,2- $d_2$ -glycolic acid (99.6 atom % D; CDN Isotopes). For enzyme activity measurements in heavy water ( $\text{D}_2\text{O}$ ), all reaction components were dissolved in  $\text{D}_2\text{O}$  except for the purified recombinant GOX. In this way, the reaction mixture contained at least 95%  $\text{D}_2\text{O}$ . Measurements were performed at pH 8, stabilized by the addition of deuterium chlo-



ride, and supplemented with 10 units of horseradish peroxidase (as this enzyme was affected by D<sub>2</sub>O) such that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conversion was always quantitative and not influenced by deuteration. Kinetic parameters were calculated by fitting the data to different equations (see “Enzyme Kinetics” below).

**HPLC Purification of Glycolate and Isotopic Measurements**—Five micrograms of purified recombinant GOX protein was mixed with 1 mM natural glycolate or deuterated glycolate in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 or with 200 μM natural glycolate or deuterated glycolate in 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and the reaction was quenched at different times by adding 1 M HCl. Samples were lyophilized and resuspended in 100 μl of distilled water. 50 μl of the resulting solution was injected for HPLC (LC-1260, Agilent Technologies). Tris, glycolate, and glyoxylate were separated by anion exchange (RS Pak KC-811, Shodex) at 30 °C with isocratic degassed water as the mobile phase (flow rate, 0.5 ml min<sup>-1</sup>). Detection was performed using a refractometer at 35 °C. Glycolate amounts were determined after HPLC separation using a standard curve. The <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio in glycolate was measured as follows. HPLC-separated compounds were desolvated and converted to CO<sub>2</sub> on line by chemical oxidation (by 15% ammonium persulfate and 5% orthophosphoric acid) using a specific interface (Liquiface, Elementar), and resulting CO<sub>2</sub> molecules entered the isotope ratio mass spectrometer (Isoprime, Elementar) under continuous flow mode (with helium as carrier gas). A Nafion® membrane placed within the interface was used to remove water generated by chemical oxidation. δ<sup>13</sup>C values were expressed relative to the standard Vienna Pee Dee Belemnite in ‰. δ<sup>13</sup>C values were calibrated using sucrose (Sigma-Aldrich) as a standard, and the δ<sup>13</sup>C value of commercial glycolate and sucrose was checked by elemental analysis coupled to isotope ratio mass spectrometry (Pyrocube-Isoprime 100, Elementar). The δ<sup>13</sup>C value was further corrected to account for concentration (isotopic non-linearity) effect using a response curve of δ<sup>13</sup>C in commercial glycolate to glycolate concentration. Such a correction was nevertheless always very small (<0.2‰), and it did not affect results to a significant extent.

**Enzyme Kinetics**—The reaction scheme depicted in Fig. 1 gives the following expression of velocity (10).

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + K_m/S + K_o/O} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $V_{\max} = k_3[E_0]$  is maximal velocity at saturating glycolate, and  $S$  and  $O$  are glycolate and dissolved oxygen (O<sub>2</sub>) concentrations, respectively. Michaelis constants for glycolate ( $K_m$ ) and oxygen ( $K_o$ ) are given by Equation 2.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}; \quad K_o = \frac{k_3}{k_5} \quad (\text{Eq. 2})$$

The apparent maximal velocity and Michaelis constant for glycolate (denoted as  $V_{\max}^{\text{app}}$  and  $K_m^{\text{app}}$ , respectively) stand for kinetic parameters when reaction kinetics are fitted to a simple (non O<sub>2</sub>-dependent) Michaelis expression, *i.e.*  $v = V_{\max}^{\text{app}}S/(K_m^{\text{app}} + S)$ .  $V_{\max}^{\text{app}}$  and  $K_m^{\text{app}}$  were simply obtained using a classical hyperbolic fit of experimental curves using SigmaPlot (Systat Software Inc.). Actual kinetic parameters ( $k_{\text{cat}} = k_3$ ,  $K_m$ , and  $K_o$ ) were obtained by step-by-step fitting of experimental data, *i.e.* by

performing multiple hyperbolic fitting at fixed  $k_{\text{cat}}$  values and choosing the best set of kinetic parameters that minimized the sum of squares (residuals). Solving simultaneously all parameters by numeric optimization of the linearized equation.

$$\ln v = \ln V_{\max} + \ln \left( 1 + \frac{K_m}{S} + \frac{K_o}{O} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

with the Excel solver software (Microsoft) yielded the same results. The knowledge of  $k_3$  allows the calculation of  $k_2$  because the commitment factor  $c = k_3/k_2$  is determined using isotope effects (see below), and therefore  $k_1$  and  $k_5$  can be determined using Equation 2.

**Isotope Effects**—<sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H isotope effects were calculated using the ratio of kinetic parameters (described below) obtained with either the natural or the deuterated substrate/solvent. <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C isotope effects were calculated from the time course of the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio in glycolate using the Rayleigh relationship.

$$\alpha = \frac{\ln(1 - f)}{\ln(1 - f) + \ln \left( \frac{R_t}{R_0} \right)} \quad (\text{Eq. 4})$$

where  $f$  is the fraction of consumed glycolate,  $R_0$  is the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio of glycolate at  $t = 0$  (before the reaction commenced), and  $R_t$  is the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio of glycolate at time  $t$ .  $f$  was determined using glycolate quantitation by HPLC (the same result was obtained with the mass 44 signal on the isotope ratio mass spectrometer. The observed KIE on the effective reaction rate is denoted as  $\alpha_{V/K}$  and is given by Equation 5.

$$\alpha_{V/K} = \frac{l \left( \frac{k_3}{K_m} \right) / h \left( \frac{k_3}{K_m} \right)}{\alpha_3 + \frac{k_3}{k_2} \cdot \frac{1}{\alpha_2}} = \alpha_1 \frac{\alpha_3 + \frac{k_3}{k_2} \cdot \frac{1}{\alpha_2}}{1 + \frac{k_3}{k_2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

where  $l$  is light and  $h$  is heavy substrate. The KIE on maximal velocity is given by Equation 6.

$$\alpha_V = \text{light } k_3 / \text{heavy } k_3 \quad (\text{Eq. 6})$$

The kinetic isotope effect on apparent turnover ( $V_{\max}^{\text{app}}$ ) is given by Equation 7.

$$\alpha_{V^{\text{app}}} = \frac{\alpha_3 + \alpha_5 \frac{K_o}{O}}{1 + \frac{K_o}{O}} \quad (\text{Eq. 7})$$

where  $\alpha_i$  is the intrinsic isotope effects associated with  $k_i$  ( $= \text{light } k_i / \text{heavy } k_i$ ), and thus,  $\alpha_3 = \alpha_V$ . In what follows, superscripts “13” and “D” attached to the symbol  $\alpha$  refer to <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H isotope effects, respectively. It should be noted that in the case of <sup>13</sup>C there is no isotope effect on  $k_1$  and  $k_2$  (no bond cleavage or formation with the carbon atom), and therefore Equation 5 simplifies to Equation 8.

$$^{13}\alpha_{V/K} = \frac{^{13}\alpha_3 + \frac{k_3}{k_2}}{1 + \frac{k_3}{k_2}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Because the  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  KIE on maximal velocity,  $^{13}\alpha_3$ , is determined experimentally (Equation 5), the commitment factor  $c = k_3/k_2$  can be calculated using either natural or deuterated glycolate. Using the obvious relationship  $^H\text{C}/^D\text{C} = ^D\alpha_3/^D\alpha_2$ ,  $^D\alpha_2$  can thus be calculated as  $^D\alpha_3/(^H\text{C}/^D\text{C})$ . Therefore,  $^D\alpha_1$  can be computed using Equation 5.  $\alpha_5$  is obtained using Equation 7.

## RESULTS

*Steady-state Kinetic Parameters of Recombinant AtGOX1, AtGOX2, and ZmGO1*—*Arabidopsis* GOX1 and GOX2 ( $\text{C}_3$  plant) and *Z. mays* GO1 ( $\text{C}_4$  plant) were expressed as N-termi-

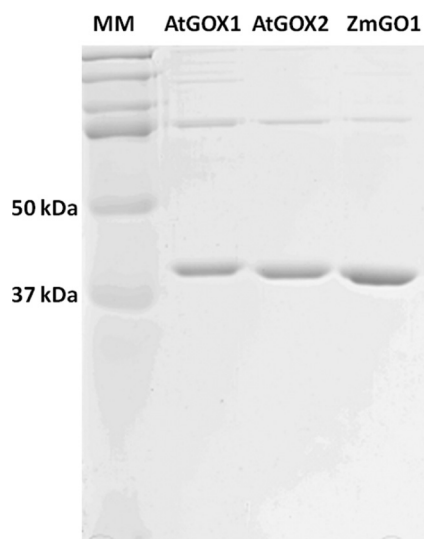


FIGURE 3. **Purity of each recombinant GOX.** Two micrograms of desalted purified GOX protein was separated by SDS-PAGE (12% acrylamide) and stained with Coomassie Blue. The expected molecular mass (MM) for each monomeric GOX is ~40 kDa.

**TABLE 1**

**Steady-state kinetic parameters of recombinant GOX enzymes assayed with either [ $^1\text{H}$ ]glycolate (H), [ $^2\text{H}$ ]glycolate (D), or  $\text{D}_2\text{O}$  as a solvent**

GOX activity was measured by following the formation of the *o*-dianisidine radical by spectrometry ( $\Delta A_{440\text{ nm}}$ ) at 30 °C and pH 8. Kinetic parameters were calculated by fitting the data to Equation 1 or using a simple Michaelis model (superscript “app”) (see “Experimental Procedures”). Values represent the mean  $\pm$  S.D. from three independent enzyme preparations for each GOX tested. Parameters in bold are significantly different compared with the control experiment (H) ( $p < 0.05$ ).

Conditions	H		D		$\text{D}_2\text{O}$	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
<b>AtGOX1</b>						
$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )	29.86	2.84	<b>14.93</b>	0.71	<b>24.41</b>	2.96
$K_m$ (mM)	0.22	0.03	<b>0.36</b>	0.02	0.20	0.02
$K_o/O$	0.17	0.12	0.33	0.07	0.25	0.13
$k_3^{\text{app}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	26.57	4.90	<b>12.35<sup>a</sup></b>	0.61	20.11	3.39
$K_m^{\text{app}}$ (mM)	0.20	0.07	<b>0.34</b>	0.08	0.17	0.04
<b>AtGOX2</b>						
$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )	30.10	6.37	<b>12.80</b>	4.32	<b>20.14</b>	2.17
$K_m$ (mM)	0.30	0.09	<b>0.57<sup>a</sup></b>	0.10	0.27	0.10
$K_o/O$	0.23	0.14	0.29	0.19	0.24	0.09
$k_3^{\text{app}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	25.07	3.03	<b>10.17</b>	1.25	<b>17.92</b>	2.55
$K_m^{\text{app}}$ (mM)	0.22	0.03	<b>0.44<sup>a</sup></b>	0.14	0.23	0.07
<b>ZmGO1</b>						
$k_3$ ( $\text{s}^{-1}$ )	34.13	3.25	<b>12.56</b>	1.48	<b>21.57</b>	2.49
$K_m$ (mM)	0.22	0.06	<b>0.33</b>	0.03	0.13	0.05
$K_o/O$	0.16	0.12	0.21	0.02	0.17	0.08
$k_3^{\text{app}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	28.16	2.94	<b>9.90</b>	0.91	<b>19.25</b>	2.87
$K_m^{\text{app}}$ (mM)	0.17	0.04	<b>0.24</b>	0.01	0.13	0.05

<sup>a</sup> Significantly different from other enzymes ( $p < 0.05$ ).

nal His-tagged proteins in *E. coli*. His-GOX proteins were purified by affinity chromatography (Fig. 3), and their identity was confirmed by mass spectrometry (data not shown). The presence of higher molecular mass proteins was occasionally observed (as seen in Fig. 3); however, it should be noted that their presence did not modify the measured kinetic parameters. For each GOX tested, their catalytic activities were measured over a range of glycolate concentrations (0.1–10 mM) at around 0.2 mM  $\text{O}_2$ . Apparent turnover rate  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$  ( $k_3^{\text{app}}$ ) and Michaelis constant  $K_m^{\text{app}}$  values were calculated by fitting to ordinary Michaelis-Menten kinetics:  $v = V_{\text{max}}^{\text{app}}/(1 + K_m^{\text{app}}/S)$ .  $K_m$  and  $K_o/O$  were calculated by numerical resolution (see “Experimental Procedures”) (Table 1) to fit the formal equation (Equation 1). There were no significant differences in the fitted kinetic parameters between GOXs from  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_4$  species with natural glycolate as a substrate (Table 1). Our different GOX proteins exhibited  $k_{\text{cat}}$  ( $k_3$ ) values from 30 to 34  $\text{s}^{-1}$  and  $K_m$  values from 0.22 to 0.30 mM as reported for recombinant GOX enzymes from plants and animals examined so far (10, 11, 13, 14, 20, 21). The  $K_o/O$  value we found ( $\approx 0.15$ ) was also comparable with that of spinach GOX (0.5 in Ref. 22). With deuterated glycolate as a substrate,  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$  and  $k_{\text{cat}}$  decreased 2–3-fold, and both  $K_m^{\text{app}}$  and  $K_m$  increased 1.5–2-fold. By contrast, the effect of changing the solvent to  $\text{D}_2\text{O}$  was visible but not large with a solvent isotope effect (SIE) value of about 1.5 on  $k_{\text{cat}}$  (see also below). The SIE was always smaller and thus close to unity on catalytic effectiveness ( $V/K$ ) regardless of the GOX isoform considered.

*Hydrogen/Deuterium and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  KIE of Recombinant AtGOX1, AtGOX2, and ZmGO1*—The observed KIE and SIE values calculated from kinetic parameters (Table 1) are listed in Table 2. We found a KIE on turnover,  $^D\alpha_v$ , of about 2 and a KIE on catalytic effectiveness,  $^D\alpha_{V/K}$ , of about 4 for each of the three GOX enzymes. All of these KIE values are significantly different from unity ( $p < 0.05$ ). In other words, the KIE on the turnover rate was larger than that on catalytic effectiveness, suggesting that catalytic steps prior to glycolate deprotonation itself ( $k_3$ ) were associated with a KIE (rate constants  $k_1$  and  $k_2$ ; Fig. 1). The

**TABLE 2****<sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H KIE (associated with deuterated glycolate) and solvent isotope effect (D<sub>2</sub>O) on GOX catalysis**Values represent the mean ± S.D. from three independent enzyme preparations for each GOX tested. Parameters shown in bold are significantly different from unity (*i.e.* no KIE) ( $p < 0.05$ ).

	Mean	S.D.
<b>AtGOX1</b>		
<sup>D</sup> α <sub>V</sub> <sup>app</sup>	2.14	0.32
<sup>D</sup> α <sub>V</sub>	2.00	0.17
<sup>D</sup> α <sub>V/K</sub> <sup>app</sup>	3.65	0.89
<sup>D</sup> α <sub>V/K</sub>	3.35	0.34
<sup>D2O</sup> α <sub>V</sub>	1.23	0.05
<sup>D2O</sup> α <sub>V/K</sub>	1.17	0.26
<sup>D</sup> α <sub>Ko/O</sub>	0.48	0.25
<b>AtGOX2</b>		
<sup>D</sup> α <sub>V</sub> <sup>app</sup>	2.46	0.01
<sup>D</sup> α <sub>V</sub>	2.46	0.68
<sup>D</sup> α <sub>V/K</sub> <sup>app</sup>	4.80	1.02
<sup>D</sup> α <sub>V/K</sub>	4.67	0.62
<sup>D2O</sup> α <sub>V</sub>	1.48	0.18
<sup>D2O</sup> α <sub>V/K</sub>	1.31	0.33
<sup>D</sup> α <sub>Ko/O</sub>	1.34	1.62
<b>ZmGO1</b>		
<sup>D</sup> α <sub>V</sub> <sup>app</sup>	2.84	0.05
<sup>D</sup> α <sub>V</sub>	2.72	0.14
<sup>D</sup> α <sub>V/K</sub> <sup>app</sup>	4.16	1.10
<sup>D</sup> α <sub>V/K</sub>	4.19	0.93
<sup>D2O</sup> α <sub>V</sub>	1.59	0.05
<sup>D2O</sup> α <sub>V/K</sub>	0.92	0.14
<sup>D</sup> α <sub>Ko/O</sub>	0.77	0.55

**TABLE 3****<sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C isotope effect in GOX catalysis with either natural or deuterated glycolate**The <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotopic effect was calculated using δ<sup>13</sup>C values (natural abundance) and glycolate concentrations (see "Experimental Procedures"). Values presented are mean ± S.D. for three replicate experiments for each GOX enzyme. Parameters shown in bold are significantly different from unity ( $p < 0.05$ ).

	AtGOX1	AtGOX2	ZmGO1
<sup>13</sup> α <sub>V</sub>	1.0440 ± 0.0011	1.0454 ± 0.0094	1.0428 ± 0.0059
<sup>13</sup> α <sub>V/K</sub>	1.0193 ± 0.0042	1.0194 ± 0.0031	1.0195 ± 0.0026
<sup>13</sup> α <sub>V</sub> <sup>app</sup>	1.0951 ± 0.01133	1.0911 ± 0.0133	1.0996 ± 0.0141
<sup>13</sup> α <sub>V/K</sub> <sup>app</sup>	1.0463 ± 0.0084	1.0423 ± 0.0093	1.0468 ± 0.0085

<sup>D</sup>α<sub>Ko/O</sub> is less than unity in AtGOX1, but it is close to unity in AtGOX2 and ZmGO1. It should nevertheless be noted that there is a quite large uncertainty (standard error) in <sup>D</sup>α<sub>Ko/O</sub>. If <sup>D</sup>α<sub>Ko/O</sub> were effectively not different from unity, then this would mean that the rate constant associated with FMN oxidation (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production) would be associated with a KIE, thereby compensating for the KIE on *k*<sub>3</sub> (Equation 7; see also "Discussion"). The SIE on turnover, <sup>D2O</sup>α<sub>V</sub>, was within the range of 1.2–1.6 for all three GOX enzymes and was significantly different from unity ( $p < 0.05$ ). The rather modest SIE suggests that within the active site exchangeable protons were not primarily involved in proton abstraction from glycolate but rather involved in weak bonds (secondary isotope effect) in the active site. Interestingly, <sup>D2O</sup>α<sub>V/K</sub> values were always very close to unity, suggesting that <sup>D2O</sup> also affected steps prior to proton abstraction (*k*<sub>2</sub> and *k*<sub>1</sub>) so that substrate binding appeared to be tighter in heavy water.

The <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C KIE in the GOX reaction for all three enzymes is shown in Table 3. The carbon isotope composition of glycolate (δ<sup>13</sup>C) was determined at different experimental times along the reaction by acid quenching followed by HPLC-co-isotope ratio mass spectrometry. The <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C KIE was calculated with Equation 6 (Rayleigh's equation) and recalculated (fractionation α − 1 multiplied by a factor 2) to convert to a positional

isotope effect (rather than a molecular average-based isotope effect). In other words, we assumed here that only one carbon atom position (C2) in glycolate was responsible for the <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C KIE and that the secondary KIE on the C1 atom position was negligible. We thus found a KIE value on the turnover rate <sup>13</sup>α<sub>V</sub> of around 1.045 and a value on the catalytic effectiveness <sup>13</sup>α<sub>V/K</sub> of around 1.019 for all three enzymes (Table 3). The fact that the KIE on V/K (effectiveness) was smaller than that on V (turnover) suggests that deprotonation (*k*<sub>3</sub>) was partially rate-limiting. Quite remarkably, <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C KIEs (both <sup>13</sup>α<sub>V</sub> and <sup>13</sup>α<sub>V/K</sub>) increased (the fractionation was doubled) when deuterated glycolate was used as a substrate, suggesting that the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C KIE originated from chemical events associated with glycolate deprotonation.

## DISCUSSION

**Recombinant GOX from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Plant Species Share Similar Kinetic Properties**—Previous studies have shown the *K<sub>m</sub>* for glycolate of leaf-purified GOX of C<sub>3</sub> species to be higher than that of C<sub>4</sub> species (see the Introduction). This could reflect the low photorespiratory activity in C<sub>4</sub> species as compared with C<sub>3</sub> species and therefore the requirement of a lower *K<sub>m</sub>* for glycolate to allow a sufficient GOX activity in C<sub>4</sub> species. In this work, recombinant His-tagged GOX enzymes from *A. thaliana* (C<sub>3</sub> species) and *Z. mays* (C<sub>4</sub> species) were compared (Table 1). The obtained kinetic parameters agreed with previous *K<sub>m</sub>*(glycolate) values from plant-purified GOXs (0.3 mM in pumpkin cotyledons (13) and *P. sativum* leaves (14)) and recombinant mammalian GOX (0.32 mM in human (20)). Our different plant GOX proteins also exhibited *k<sub>cat</sub>* values similar to those found in the literature (27 s<sup>−1</sup> for purified pumpkin cotyledon GOX (14), 20 s<sup>−1</sup> for recombinant spinach GOX (10), and 15.6 and 24 s<sup>−1</sup> for purified and recombinant human liver GOXs (11, 21). Therefore, our GOX proteins appear to be fully functional. It is possible that the differences in *K<sub>m</sub>* values reported in the literature arise from differing degrees of protein purity, the method used to purify each protein, and/or the presence or absence of heteromeric GOX protein complexes. However, it is also possible that they reflect a differential post-translational modification occurring only in plant-purified GOX proteins from C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant species. To date, two post-translational modifications for GOX proteins have been reported: nitrosylation (which inhibits GOX activity (23)) and phosphorylation (see Ref. 24 and the PhosPhAt database). In fact, the recombinant proteins used in this work were found to be neither phosphorylated nor nitrosylated (using mass spectrometry; data not shown).

**Does GOX Catalysis Follow a Hydride Transfer Mechanism?**—Two scenarios (see the Introduction and Fig. 2) have been described in the literature to describe the catalytic mechanism of α-hydroxy-acid oxidase family members: a mechanism involving a carbanion (stepwise mechanism) and a hydride transfer (concerted but maybe asynchronous mechanism). Structural data of *Aerococcus viridians* lactate oxidase led to the proposal of a hydride transfer mechanism (25). With the recent advances in the use of stable isotopes (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, and <sup>2</sup>H), the measurement of KIEs in bond cleavage have also provided evidence mostly in favor of a concerted hydride transfer in flavo-protein catalysis (26). The <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N isotope effects associated



with Ser oxidation by D-amino-acid oxidase, sarcosine oxidation by *N*-methyltryptophan oxidase, and alanine oxidation by tryptophan 2-monooxygenase suggested a concerted proton abstraction mechanism for these reactions (27–29). In the case of serine oxidation by D-amino-acid oxidase, there is a KIE (corrected for the isotope effect of deprotonation of  $-\text{NH}_3^+$ ) of 0.996 (*i.e.* 4‰ against  $^{14}\text{N}$ ), consistent with the production of a  $\text{C}=\text{NH}_2^+$  intermediate rather than a carbanion ( $\text{C}^--\text{NH}_2$ ) (27). Similarly, a hydride transfer mechanism has been demonstrated in tryptophan 2-monooxygenase (28). In flavocytochrome  $b_2$  (an  $\alpha$ -hydroxy-acid oxidase family member), the modest isotope effect with  $[^2\text{H}]\text{lactate}$  suggested that substrate deprotonation was only partially rate-limiting, which is not strictly compatible with a carbanion-based mechanism. However, the fact that there was no solvent isotope effect ( $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ) on flavin reduction suggested that cleavage of the O–H bond was not a critical chemical event to initiate the reaction, that is probably not required for C–H bond cleavage, thereby suggesting that a carbanion intermediate was plausible (30). With that said, the hydride transfer mechanism was given further support by the characterization of the Tyr-to-Phe mutant, which exhibited both a large KIE (with  $[^2\text{H}]\text{lactate}$ ) and a significant solvent isotope effect, demonstrating the interdependence of C–H and O–H cleavage (34). Therefore, we find arguments for and against a hydride transfer mechanism in flavoprotein oxidases, and critically, no specific studies had been carried out using GOX as an enzyme model. Previous works have suggested the reductive half-reaction to be rate-limiting (10), but the question of the energetics and the nature of the transition states in glycolate oxidation remained uncertain. Here, we investigated the reaction mechanism of plant GOX by taking advantage of  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  and hydrogen/deuterium isotope effects (Table 2 and 3). Because of the conserved structure and residues involved in the active site of plant (6, 12, 22) and mammalian (9) GOX enzymes, our conclusions concerning the catalytic mechanism (see below) are probably true also for the closely related mammalian enzyme.

In all GOX proteins assayed with  $[^2\text{H}]\text{glycolate}$ , we found a rather modest KIE on maximal velocity,  $^D\alpha_v$ , between 2 and 2.7 (Table 2), suggesting that proton abstraction ( $k_3$ ) was only partially rate-limiting. In addition, the KIE on effectiveness,  $^D\alpha_{v/K}$ , was approximately double the  $^D\alpha_v$  (values between 3.3 and 4.8). This suggests that glycolate binding itself is also associated with a significant isotope effect (inverse isotope effect on  $K_m$ ,  $\approx 0.6$ ), meaning that the formation of the Michaelis complex was associated with a strong change in the geometry of glycolate. Alternatively, other reversible steps following substrate binding and prior to glycolate deprotonation may take place (substrate “preprocessing” before the catalytic step,  $k_3$ ), implying an alteration of the  $\text{C}^\alpha\text{--H}$  force constant. The chemical events responsible for the isotope effect at this hydrogen atom position in such early reaction steps are still to be elucidated. Under the assumption that substrate preprocessing/repositioning occurs during or just after binding, specific residues of the active site are expected to have key roles in determining both  $K_m$  and  $k_{\text{cat}}$  because incomplete preprocessing/repositioning would impede subsequent catalysis. In fact, such residues seem to occur in the GOX active site. In the spinach enzyme, Trp<sup>108</sup> has been found to be important

for both substrate binding and catalysis: when Trp<sup>108</sup> was replaced by Ser, the enzyme exhibited a very low  $K_{m(\text{glycolate})}$  (about 100-fold lower) and very low  $k_{\text{cat}}$  values with various substrates (glycolate, mandelate, lactate, and 2-hydroxybutyrate) (12). This residue is located in the substrate pocket (close to FMN) and is not conserved in hydroxy-acid oxidases and dehydrogenase flavoproteins. It is believed that amino acids in this position have a side-chain length adapted to the size of the substrate (7, 12) so that substrate binding is adequately tight and associated with possible changes in geometry, thereby facilitating subsequent catalysis (glycolate oxidation). Active site preorganization has been presumed in a similar reaction catalyzed by choline oxidase, consisting in O–H stretching in the  $\alpha$ -hydroxyl group to facilitate proton abstraction in subsequent steps (32, 33).

Regardless of the chemical events involved prior to glycolate oxidation itself ( $k_3$ ), the fact that the latter did not appear to be strictly rate-limiting does not agree with a carbanion-based mechanism, which would have implied a large  $V/K$  kinetic isotope effect (rate-limiting formation of a dissociative transition state; for reviews, see Refs. 26 and 31). Furthermore, one may take advantage of carbon isotope effects ( $^{13}\alpha_v$  and  $^{13}\alpha_{v/K}$ ; Table 3) to compute the commitment factor associated with  $k_3$ . Using Equation 8, we found a commitment factor,  $k_3/k_2$ , of  $\approx 1.3$  and 1.1 with natural and deuterated glycolate, respectively. In other words, the deuterium substitution in C2 had a negligible effect on the kinetic commitment associated with  $k_3$ , also indicating that the formation of a carbanion is highly unlikely. It thus appears more plausible that the transition state associated with glycolate oxidation does not imply a substantial change of the C2 geometry (formation of a charged species) but rather involves a concerted bond rearrangement with O2 (hydroxyl) and N5 (FMN). It should also be noted that there was an SIE on  $k_3$ , suggesting that exchangeable protons were somehow involved in that chemical step. This effect is more consistent with a hydride transfer mechanism simply because the hydroxyl proton in Tyr residues is exchangeable with the solvent. Exchange rates in Tyr residues buried in enzyme active sites are about  $9\text{ s}^{-1}$  (35), that is 3 times slower than the turnover rate. Therefore, during enzymatic assays in  $\text{D}_2\text{O}$ , Tyr residues happened to be only partially deuterated, causing a modest isotope effect. Under the hydride transfer hypothesis, if we assume that about one-third of Tyr residues were deuterated and that the secondary KIE associated with hydrogen/deuterium substitution at Tyr<sup>129</sup> is near 2, we would expect an SIE of about 1.3, which falls within the observed range. By contrast, under the carbanion hypothesis, no significant solvent isotope effect would be expected on  $k_3$  simply because no Tyr residue primarily participates in bond rearrangements in O2. We nevertheless recognize that other effects may have contributed to the observed SIE such as an effect of solvent viscosity, which is indeed higher in heavy water (36). In fact, recombinant human liver GOX has lower  $k_{\text{cat}}$  and  $k_{\text{cat}}/K_m$  values in a more viscous solvent such as glycerol (21). Also, three water molecules have been reported to participate in the catalytic site architecture in recombinant spinach GOX, and their presumed role is to maintain the H-bond network around FMN in the absence of glycolate (6, 37). Therefore, their replacement by  $\text{D}_2\text{O}$  might affect



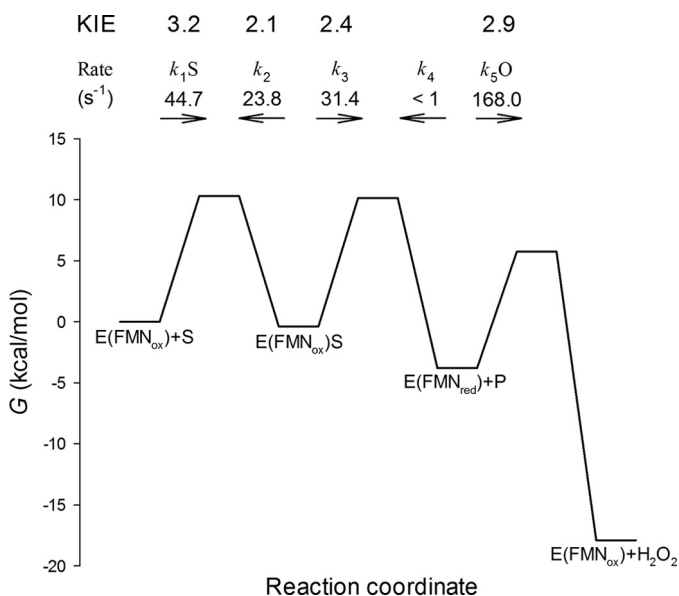


FIGURE 4. **Kinetic energy profile of the GOX-catalyzed reaction.** Intrinsic hydrogen/deuterium KIEs (when  $[^2H_2]$ glycolate is used as a substrate) associated with each elementary step are indicated as well as rate constants (in  $s^{-1}$ ). For rates that depend upon substrate concentration ( $k_1S$  and  $k_5O$ ), we assumed a value of 0.2 mM. This profile was drawn assuming that the energy barrier associated with  $k_3$  was 10.5 kcal mol $^{-1}$  (see text). S, glycolate; O, dissolved  $O_2$ ; P, glyoxylate. The overall reaction is shown to be exergonic due to the redox potential  $E'_0$  of glyoxylate/glycolate (−92 mV) and  $O_2/H_2O_2$  (+295 mV) couples.

substrate binding. Here, we observed a tighter glycolate binding (normal SIE on  $K_m$ ), suggesting that the H-bond network was altered in the presence of  $D_2O$ .

**Kinetic Energy Profile of the GOX-catalyzed Reaction**—To gain insight into the effectiveness of GOX catalysis, we took advantage of the KIE values obtained here to compute commitment factors and therefore generate a kinetic energy profile of the reaction (38). Under the assumption that kinetic constants are given by  $k = \kappa k_B T / h \cdot \exp(-\Delta G/RT)$ , the ratio of two rate constants  $k_i$  and  $k_{ii}$  gives the difference in free energy:  $RT \ln(k_i/k_{ii}) = \Delta \Delta G_{ii} - i$ . Using our KIE values, the kinetic profile of the reaction was reconstructed with the energy barrier of one step fixed at a certain value (for a recent similar example on Rubisco, see Ref. 39). The effective free energy barrier of the turnover rate ( $k_{cat} = k_3$ ) is assumed to be 44 kJ mol $^{-1}$  (10.5 kcal mol $^{-1}$ ) considering the apparent activation energy ( $E_a$ ) on GOX velocity (using data obtained at different temperatures (20, 40)). This value is in agreement with  $E_a$  values obtained for similar enzymes: 46 kJ mol $^{-1}$  for lactate oxidase (the ancestor of GOX (2)) and 56 kJ mol $^{-1}$  for D-amino-acid oxidase (41, 42). The  $k_3$  itself corresponds here to the turnover rate at saturating glycolate and was found to be near 31 s $^{-1}$ . It should be noted that we assumed glycolate reprotonation (reverse reaction) to be negligible ( $k_4 \approx 0$ ). In fact, enzyme catalysis proceeds forward (FMN reduction by glycolate) even in the absence of dissolved  $O_2$ , indicating that glycolate oxidation is irreversible (10). As stated above, the  $^{12}C/^{13}C$  KIE indicated that the commitment factor  $k_3/k_2$  was near 1.3, and thus  $k_2$  was about 23 s $^{-1}$  (Fig. 4). Using this value and  $K_m$  allowed us to compute  $k_1S$  (where  $S$  is glycolate concentration), which was found to be near 44 s $^{-1}$  at 0.2 mM glycolate (physiological concentration). Thus, no specific

step of the reductive half-reaction appeared to be rate-limiting because rates were all within the same order of magnitude. By contrast, the oxidative half-reaction appeared to be rapid because  $k_3/k_5[O_2]$  was about 0.1–0.2 (Table 1). In other words, the reductive half-reaction was limiting when compared with the oxidative half-reaction, but no specific step within the reductive half-reaction was strictly rate-limiting. Unsurprisingly therefore, there was no large difference in energy barriers along the reductive half-reaction. The overall reaction was driven by the free enthalpy drawdown (redox equilibrium at physiological concentrations) (Fig. 4).

Intrinsic isotope effects associated with each elementary step were found to be within the 2.0–3.2 range with no step that fractionated highly against  $^2H$  (KIE of 4 or above) (Fig. 4). Because in hydrogen transfer events KIE is expected to be maximal when the transition state is symmetrical (for a practical example on formate dehydrogenase, see Ref. 43), the KIE on  $k_3$  observed here (2.4) rather suggests a late transition state associated with glycolate deprotonation. Accordingly, the relatively high intrinsic  $^{12}C/^{13}C$  isotope effect of about 1.045 suggests that deprotonation is not the sole chemical event occurring in step  $k_3$  because a simple C–H bond stretching (wave number,  $\approx 3000$  cm $^{-1}$ ) is expected to be associated with an intrinsic KIE of about 1.025. A simultaneous rearrangement of the hydroxyl group (to a C=O bond) and hydrogen abstraction in the transition state, indicative of a concerted hydride transfer, is thus likely. Rather similar situations with the same order of magnitude for the carbon isotope effect ( $\approx 1.040$ ) involving similar chemical rearrangements (carbonyl formation along hydride transfer at C1 in the glucose dehydrogenase (44) or formate dehydrogenase (45) reactions) have been found. We nevertheless recognize that in Fig. 4 the formation of a late transition state is not associated with a high energy barrier. In this figure, the profile was reconstructed using the apparent energy barrier associated with  $k_3$  (temperature-response curves reported in the literature; see above), and this should be examined further in future studies. Uncertainty also remains as to whether the reaction proceeds via a hydrogen tunneling as found in the similar reaction of choline oxidase (see Ref. 33) and suggested by the irreversibility of glycolate deprotonation. Future studies are thus warranted to explore the temperature response of  $^1H/^2H$  KIE and the value of Eyring pre-exponential factors to determine whether the transition state is classical or consistent with hydride ion tunneling.

In conclusion, by measuring kinetic isotope effects, it is shown that the short-chain  $\alpha$ -hydroxy-acid oxidase GOX reaction mechanism involves a hydride transfer mechanism, thereby strengthening the idea that this mechanism is common to  $\alpha$ -hydroxy-acid oxidase family members. Interesting, the analysis of our data suggested that glycolate deprotonation was only partially rate-limiting and that the formation of the substrate-enzyme complex was also an important limiting factor. Such data could be useful to help design drugs and/or herbicides. Indeed, our KIE values could be applied to compute steric and electronic maps for the transition state of the GOX reaction (46). This would allow the synthesis of stable transition state analogs that are powerful enzymatic inhibitors. Inhibition of GOX has been considered as a possible treatment for several

oxalate-mediated diseases in humans such as hyperoxaluria and renal lithiasis (47) and in plants as a target for herbicide action (48). Mutants of photorespiratory enzymes are non-viable in air, exhibiting severely stunted growth and chlorotic leaves (e.g. Ref. 49). This has been seen for the *go1* (GOX) mutant of *Z. mays* (17). In the case of plant photorespiratory GOX, because of the similarity in enzymatic parameters, KIE values, and reaction mechanism of both C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plant enzymes, a transition state analog herbicide would not be selective (that is, it would not be possible to design a specific herbicide to eliminate C<sub>3</sub> weeds only in a maize field), but it could rather be used as a general weed killer. Interestingly, the introduction of a photorespiratory glycolate bypass in the chloroplast by the expression of several transgenes (50, 51) has led to increases in *Arabidopsis* biomass (see Ref. 50) and potato tuber yield (51). By inhibiting GOX activity in such plants, it might be possible to further improve the observed transgenic effects on yield by increasing the flux through the bypass.

Furthermore, stable carbon isotopes at natural abundance have been used over the years to examine physiological, ecological, and geochemical processes. It is possible to exploit  $\delta^{13}\text{C}$  in metabolites to calculate metabolic fluxes; however, to undertake such an approach, it is crucial to know the isotopic fractionation of each enzymatic reaction during a given biochemical and biophysical process (see Ref. 52 and references therein). The fact that *in vitro* plant GOX activity leads to an isotopic discrimination at natural abundance as observed in this work (Table 3) means that the  $\delta^{13}\text{C}$  of glycolate (and/or glyoxylate) of leaf extracts could be tested to calculate *in planta* photorespiratory fluxes.

**Acknowledgments**—We are very thankful to Elementar France and Agilent Technologies for loan of the Liqueface and the HPLC, respectively. We thank the Plateforme d'Analyse Proteomique de Paris Sud-Ouest (Unité Mixte de Recherche de Génétique Végétale, Ferme du Moulon, Gif sur Yvette, France) for mass spectroscopy analysis of the recombinant proteins.

## REFERENCES

- Diép Lè, K. H., and Lederer, F. (1991) Amino acid sequence of long chain  $\alpha$ -hydroxy acid oxidase from rat kidney: a member of the family of FMN-dependent  $\alpha$ -hydroxy acid-oxidizing enzymes. *J. Biol. Chem.* **266**, 20877–20881
- Esser, C., Kuhn, A., Groth, G., Lercher, M. J., and Maurino, V. G. (2014) Plant and animal glycolate oxidases have a common eukaryotic ancestor and convergently duplicated to evolve long-chain 2-hydroxy acid oxidases. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1089–1101
- Richardson, K. E., and Tolbert, N. E. (1961) Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. *J. Biol. Chem.* **236**, 1280–1284
- Williams, H. E., and Smith L. H., Jr. (1968) Disorders of oxalate metabolism. *Am. J. Med.* **45**, 715–735
- Friend, A. D. (2010) Terrestrial plant production and climate change. *J. Exp. Bot.* **61**, 1293–1309
- Lindqvist, Y., and Brändén, C. I. (1989) The active site of spinach glycolate oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**, 3624–3628
- Tsai, C.-L., Gokulan, K., Sobrado, P., Sacchettini, J. C., and Fitzpatrick, P. F. (2007) Mechanistic and structural studies of H373Q flavocytochrome *b<sub>2</sub>*: effects of mutating the active site base. *Biochemistry* **46**, 7844–7851
- Müh, U., Williams, C. H., Jr., and Massey, V. (1994) Lactate monooxygenase: site-directed mutagenesis of the postulated active site base histidine 290. *J. Biol. Chem.* **269**, 7989–7993
- Bourhis, J. M., Vignaud, C., Pietrancosta, N., Guéritte, F., Guénard, D., Lederer, F., and Lindqvist, Y. (2009) Structure of human glycolate oxidase in complex with the inhibitor 4-carboxy-5-[(4-chlorophenyl)-sulfanyl]-1,2,3-thiadiazole. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **65**, 1246–1253
- Macheroux, P., Massey, V., Thiele, D. J., and Volokita, M. (1991) Expression of spinach glycolate oxydase in *Saccharomyces cerevisiae*: purification and characterization. *Biochemistry* **30**, 4612–4619
- Pennati, A., and Gadda, G. (2011) Stabilization of an intermediate in the oxidative half-reaction of human liver glycolate oxidase. *Biochemistry* **50**, 1–3
- Stenberg, K., Clausen, T., Lindqvist, Y., and Macheroux, P. (1995) Involvement of Tyr24 and Trp108 in substrate binding and substrate specificity of glycolate oxidase. *Eur. J. Biochem.* **228**, 408–416
- Nishimura, M., Akhmedov, Y. D., Strzalka, K., and Akazawa, T. (1983) Purification and characterization of glycolate oxidase from pumpkin cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 397–402
- Devi, M. T., Rajagopalan, A. V., and Raghavendara, A. S. (1996) Purification and properties of glycolate oxydase from plants with different photosynthetic pathways: distinctness of C<sub>4</sub> species from that of a C<sub>3</sub> species and a C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate. *Photosynth. Res.* **47**, 231–238
- Popov, V. N., Dmitrieva, E. A., Eprintsev, A. T., and Igamberdiev, A. U. (2003) Glycolate oxidase isoforms are distributed between the bundle sheath and mesophyll tissues of maize leaves. *J. Plant Physiol.* **160**, 851–857
- Hackenberg, C., Kern, R., Hüge, J., Stal, L. J., Tsuji, Y., Kopka, J., Shiraiwa, Y., Bauwe, H., and Hagemann, M. (2011) Cyanobacterial lactate oxidases serve as essential partners in N<sub>2</sub> fixation and evolved into photorespiratory glycolate oxidases in plants. *Plant Cell* **23**, 2978–2990
- Zelitch, I., Schultes, N. P., Peterson, R. B., Brown, P., and Brutnell, T. P. (2009) High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiol.* **149**, 195–204
- Jossier, M., Bouly, J.-P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley S., Grahame Hardie, D., and Thomas, M. (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signalling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **59**, 316–328
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
- Vignaud, C., Pietrancosta, N., Williams, E. L., Rumsby, G., and Lederer, F. (2007) Purification and characterization of recombinant human liver glycolate oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **465**, 410–416
- Pennati, A., and Gadda, G. (2009) Involvement of ionizable groups in catalysis of human liver glycolate oxidase. *J. Biol. Chem.* **284**, 31214–31222
- Fitzpatrick, P. F. (2007) Insights into the mechanisms of flavoprotein oxidases from kinetic isotope effects. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* **50**, 1016–1025
- Kurtz, K. A., Rishavy, M. A., Cleland, W. W., and Fitzpatrick, P. F. (2000) Nitrogen isotope effects as probes of the mechanism of D-amino acid oxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 12896–12897
- Ralph, E. C., Anderson, M. A., Cleland, W. W., and Fitzpatrick, P. F. (2006) Mechanistic studies of the flavoenzyme tryptophan 2-monooxygenase: deuterium and <sup>15</sup>N kinetic isotope effects on alanine oxidation by an L-amino acid oxidase. *Biochemistry* **45**, 15844–15852
- Furuichi, M., Suzuki, N., Dhakshnamoorthy, B., Minagawa, H., Yamagishi, R., Watanabe, Y., Goto, Y., Kaneko, H., Yoshida, Y., Yagi, H., Waga, I., Kumar, P. K., and Mizuno, H. (2008) X-ray structures of *Aerococcus viridis* lactate oxidase and its complex with D-lactate at pH 4.5 show an  $\alpha$ -hydroxy acid oxidation mechanism. *J. Mol. Biol.* **378**, 436–446
- Macheroux, P., Kieweg, V., Massey, V., Söderlind, E., Stenberg, K., and Lindqvist, Y. (1993) Role of tyrosine 129 in the active site of spinach glycolate oxidase. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1047–1054
- Ortega-Galisteo, A. P., Rodríguez-Serrano, M., Pazmiño, D. M., Gupta, D. K., Sandalio, L. M., and Romero-Puertas, M. C. (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **63**, 2089–2103
- Hodges, M., Jossier, M., Boex-Fontvieille, E., and Tcherkez, G. (2013) Protein phosphorylation and photorespiration. *Plant Biol.* **15**, 694–706
- Quaye, O., Lountos, G. T., Fan, F., Orville, A. M., and Gadda, G. (2008)

- Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* **47**, 243–256
30. Gadda, G. (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* **47**, 13745–13753
31. Cleland, W. W. (2005) The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 2–12
32. Ralph, E. C., Hirschi, J. S., Anderson, M. A., Cleland, W. W., Singleton, D. A., and Fitzpatrick, P. F. (2007) Insights into the mechanism of flavo-protein-catalyzed amino oxidation from nitrogen isotope effects on the reaction of *N*-methyltryptophan oxidase. *Biochemistry* **46**, 7655–7664
33. Sobrado, P., Daubner, S. C., and Fitzpatrick, P. F. (2001) Probing the relative timing of hydrogen abstraction steps in the flavocytochrome *b<sub>2</sub>* reaction with primary and solvent deuterium isotope effects and mutant enzymes. *Biochemistry* **40**, 994–1001
34. Sobrado, P., and Fitzpatrick, P. F. (2003) Solvent and primary deuterium isotope effects show that lactate CH and OH bond cleavages are concerted in Y254F flavocytochrome *b<sub>2</sub>*, consistent with a hybrid transfer mechanism. *Biochemistry* **42**, 15208–15214
35. Takeda, M., Jee, J., Ono, A. M., Terauchi, T., Kainosho, M. (2009) Hydrogen exchange rate of tyrosine hydroxyl groups in proteins as studied by the deuterium isotope effect on *C<sub>α</sub>* chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18556–18562
36. Hardy, R. C., and Cottingham, R. L. (1949) Viscosity of deuterium oxide and water in the range 5° to 125° C. *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **42**, 573–578
37. Stenberg, K., and Lindqvist, Y. (1997) Three-dimensional structures of glycolate oxidase with bound active-site inhibitors. *Protein Sci.* **6**, 1009–1015
38. Albery, W. J., and Knowles, J. R. (1976) Free-energy profile of the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **15**, 5627–5631
39. Tcherkez, G. G., Bathellier, C., Stuart-Williams, H., Whitney, S., Gout, E., Bligny, R., Badger, M., and Farquhar, G. D. (2013) D<sub>2</sub>O solvent isotope effects suggest uniform energy barriers in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase catalysis. *Biochemistry* **52**, 869–877
40. Rocha, M. J., Rocha, E., Resende, A. D., and Lobo-da-Cunha, A. (2003) Measurement of peroxisomal enzyme activities in the liver of brown trout (*Salmo trutta*), using spectrophotometric methods. *BMC Biochem.* **4**, 2
41. Ghisla, S., and Massey, V. (1977) Studies on the mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase. Proton uptake and release during the binding of transition state analogs. *J. Biol. Chem.* **252**, 6729–6735
42. Pollegioni, L., Blodig, W., and Ghisla, S. (1997) On the mechanism of D-amino acid oxidase: structure/linear free energy correlations and deuterium kinetic isotope effects using substituted phenylglycines. *J. Biol. Chem.* **272**, 4924–4934
43. Scharschmidt, M., Fisher, M. A., and Cleland, W. W. (1984) Variation of transition-state structure as a function of the nucleotide in reactions catalyzed by dehydrogenases. 1. Liver alcohol dehydrogenase with benzyl alcohol and yeast aldehyde dehydrogenase with benzaldehyde. *Biochemistry* **23**, 5471–5478
44. Rendina, A. R., Hermes, J. D., and Cleland, W. W. (1984) Use of multiple isotope effects to study the mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochemistry* **23**, 6257–6262
45. Hermes, J. D., Morrical, S. W., O'Leary, M. H., and Cleland, W. W. (1984) Variation of transition-state structure as a function of the nucleotide in reactions catalyzed by dehydrogenases. 2. Formate dehydrogenase. *Biochemistry* **23**, 5479–5488
46. Gluza, K., and Kafarski, P. (2013) in *Drug Discovery* (El-Shemy, H. A., ed) pp. 325–372, InTech, 10.5772/52504
47. Williams, H. W., Eichler, E., Randall, W. C., Rooney, C. S., Cragoe, E. J., Jr., Streeter, K. B., Schwam, H., Michelson, S. R., Patchett, A. A., and Taub, D. (1983) Inhibitors of glycolic acid oxidase. 4-Substituted 2,4-dioxobutanoic acid derivatives. *J. Med. Chem.* **26**, 1196–1200
48. Fendrich, G., and Ghisla, S. (1982) Studies of glycolate oxidase from pea leaves. Determination of stereospecificity and mode of inhibition by  $\alpha$ -hydroxybutyrate. *Biochim. Biophys. Acta* **702**, 242–248
49. Timm, S., Mielewicz, M., Florian, A., Frankenbach, S., Dreissen, A., Hocken, N., Fernie, A. R., Walter, A., and Bauwe, H. (2012) High-to-low CO<sub>2</sub> acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. *PLoS One* **7**, e42809
50. Peterhansel, C., Krause, K., Braun, H. P., Espie, G. S., Fernie, A. R., Hanson, D. T., Keech, O., Maurino, V. G., Mielewicz, M., and Sage, R. F. (2013) Engineering photorespiration: current state and future possibilities. *Plant Biol.* **15**, 754–758
51. Nölke, G., Houdelet, M., Kreuzaler, F., Peterhansel, C., and Schillberg, S. (2014) The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polypeptide in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotechnol. J.* **12**, 734–742
52. Tcherkez, G., Mahé, A., and Hodges, M. (2011) <sup>12</sup>C/<sup>13</sup>C fractionations and plant metabolism. *Trends Plant Sci.* **16**, 499–506

## Résumé des articles II et III

La photorespiration est une voie majeure du métabolisme primaire des plantes, dont la fonction principale est de recycler le 2-PG, issu de l'activité oxygénase de la RuBisCO. Ce recyclage fait intervenir plusieurs cofacteurs, métabolites et enzymes localisés dans le chloroplaste, le peroxysome, la mitochondrie et le cytosol, et qui sont partagés avec d'autres voies du métabolisme primaire foliaire (la photosynthèse, le cycle de Krebs, l'assimilation de l'azote et le métabolisme des acides aminés, le métabolisme C<sub>1</sub>) (cf Introduction). Cette voie est une cible pour l'amélioration des plantes puisqu'elle consomme de l'énergie et du pouvoir réducteur, et qu'elle produit du CO<sub>2</sub> et du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> à partir de molécules organiques. Néanmoins, la photorespiration n'est pas un cycle futile puis qu'elle est importante pour la croissance et le développement des plantes. En effet des mutants pour des enzymes de ce cycle montrent des phénotypes « photorespiratoires » dans l'air (dont la chlorose, du mort cellulaire, et un retard de croissance). Certains de ces phénotypes peuvent être absents lorsque les plantes sont cultivées en conditions de fort CO<sub>2</sub> (où l'activité oxygénase de la RuBisCO est fortement réduite). La diversité des phénotypes « photorespiratoires » observés (cf Introduction) est probablement le reflet de la complexité des interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire de la plante. Certaines de ses interactions ne sont pas encore bien caractérisées, et ont retenu notre attention au cours de cette thèse :

- ✓ Le(s) mécanisme(s) d'inhibition de la photosynthèse chez les mutants photorespiratoires d'*A. thaliana* : plusieurs hypothèses existent mais certaines sont contradictoires entre elles (par exemple, l'inhibition par le glyoxylate, alors que certains mutants n'accumulent pas de glyoxylate).
- ✓ L'impact d'une baisse de la photorespiration sur l'activité du cycle de Krebs : des incertitudes planent car des impacts positifs et négatifs sur l'activité du cycle de Krebs ont été observés chez *Solanum tuberosum* et *Xanthium strumarium*, lorsque la photorespiration est modifiée (soit par le rapport CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> dans l'air soit par l'étude d'un mutant photorespiratoire) (Tcherkez *et al.*, 2008 ; Bykova *et al.*, 2005) (cf Introduction).
- ✓ L'impact d'une baisse de la photorespiration sur le métabolisme des acides aminés : la glycine et la sérine sont essentiellement produites par la photorespiration à la lumière, le glutamate est consommé par l'activité d'une aminotransférase photorespiratoire puis l'ammonium photorespiratoire doit être réassimilé par le cycle GS/GOGAT.

Dans les deux chapitres de résultats qui suivent, nous avons essayé d'apporter des éléments de réponse nouveaux sur ces différentes interactions. A cette fin, nous avons utilisé des mutants



d'enzymes photorespiratoires chez *A. thaliana* encore peu ou pas caractérisés dans la littérature. L'idée étant de ralentir le flux photorespiratoire afin qu'il devienne limitant pour la plante, et d'observer l'impact sur le métabolisme primaire, notamment la photosynthèse, et le métabolisme des acides organiques et aminés.

**Dans le deuxième article**, nous avons utilisé des mutants d'insertion ADN-T pour le gène *GGT1*, codant pour la glutamate:glyoxylate aminotransférase photorespiratoire. Cette enzyme utilise du glutamate et produit du 2-OG. Ainsi, l'étude de mutants pour cette enzyme pourrait nous fournir des informations sur l'interaction entre la photorespiration et la photosynthèse mais aussi avec le métabolisme des acides aminés et organiques. Avant le début de cette thèse, un mutant pour cette enzyme avait été décrit dans la littérature. Cependant, la plupart des expériences avaient été réalisées sur des plantes cultivées *in vitro* sur un milieu gélosé supplémenté en sucre, à faible lumière au stade de 2 semaines de croissance. Ces conditions sont plutôt limitantes pour la photosynthèse et la photorespiration, et de ce fait, peuvent mener à la sous-estimation de l'impact de la mutation. Par ailleurs, aucune donnée sur l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> n'avait été rapportée chez ce mutant.

Nous avons donc caractérisé deux lignées d'insertion ADN-T pour le gène *GGT1*. Les plantes ont été cultivées sur terreau, soit dans l'air, soit en fort CO<sub>2</sub> puis transférées dans l'air, afin d'observer l'effet de la mutation sur le métabolisme primaire et le développement de la plante. L'impact de la baisse de la photorespiration sur le métabolisme primaire a été mesuré de plusieurs façons :

- Les propriétés physiologiques des feuilles de ces mutants ont été mesurées avec un LiCOR à partir d'échanges gazeux (l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, la transpiration, les courbes de réponse à la lumière et au CO<sub>2</sub>, le « post-illumination burst » (PIB)) et de fluorescence chlorophyllienne (pour calculer le transfert d'électrons photosynthétique (ETR) et le quenching non-photochimique (NPQ)).
- Les activités RuBisCO et l'état d'activation de la RuBisCO ont été mesurés sur des extraits de protéines solubles de feuilles par une méthode de couplage enzymatique en microplaque.
- Les quantités de certains cofacteurs associés à l'activité de la chaîne de transfert d'électrons photosynthétique et la balance énergétique et redox de la feuille (ATP, ADP, NADP<sup>+</sup>, NADPH, NAD<sup>+</sup>, NADH) ont été mesurées par des méthodes de couplage enzymatique en microplaque.

- Les quantités de divers métabolites primaires ont été mesurées de façon relative par GC-MS ou absolue par HPLC (uniquement pour les acides aminés).

Les résultats démontrent que :

- Les mutants *ggt1* cultivés dans l'air assimilent moins de CO<sub>2</sub> que les plantes sauvages, à cause d'une plus faible quantité de RuBisCO foliaire. Ceci s'accompagne d'un retard de croissance et de développement qui, cependant, n'affecte pas la balance carbone/azote dans les feuilles.
- Suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, l'inhibition rapide de la photosynthèse observée chez ces mutants serait due à un défaut de recyclage du carbone photorespiratoire qui ralentirait l'activité du cycle de Calvin-Benson, plutôt qu'à une diminution de l'activité RuBisCO.
- L'acclimatation à long terme (12 jours) des mutants *ggt1* après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air induit une diminution de la quantité de RuBisCO dans les feuilles, ainsi qu'un léger retard de croissance.

**Dans le troisième article**, nous avons étudié des mutants d'insertion ADN-T pour les gènes photorespiratoires *GOX1* et *GOX2*. Les simples mutants ne présentaient pas de phénotype photorespiratoire dans l'air, donc nous avons éteint l'expression des deux gènes chez *A. thaliana* par la technique de « artificial microRNA interference ». La lignée amiRNA obtenue, *amiRgox1/2*, présentait un phénotype photorespiratoire dans l'air, qui était absent en conditions de fort CO<sub>2</sub>. Cependant, ce phénotype était trop marqué dans l'air (plante naine) pour réaliser des mesures sur des feuilles. Aussi, nous avons décidé d'entreprendre des expériences sur des plantes avant et après transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Dans un premier temps, cette lignée *amiRgox1/2* a été complémentée avec l'ORF codant la GOX de maïs (*ZmGO1*) sous le contrôle du promoteur photorespiratoire du gène *SHMT1*. L'impact de la baisse de la photorespiration sur le métabolisme primaire a ensuite été mesuré de plusieurs façons :

- Les propriétés physiologiques des feuilles de ces mutants ont été mesurées avec un LiCOR à partir d'échanges gazeux (l'assimilation nette de CO<sub>2</sub>, la transpiration, les courbes de réponse à la lumière et au CO<sub>2</sub>, le « post-illumination burst » (PIB)) et de fluorescence

chlorophyllienne (pour calculer le transfert d'électrons photosynthétique (ETR) et le quenching non-photochimique (NPQ)).

- L'allocation du carbone nouvellement assimilé dans des métabolites primaires des feuilles a été mesurée par analyses de résonnance magnétique nucléaire (RMN) du  $^{13}\text{C}$  suite à des marquages au  $^{13}\text{CO}_2$  pendant 5 h.
- Divers métabolites primaires ont été mesurés de façon relative par GC-MS ou absolue par HPLC (uniquement pour les acides aminés).
- Des marqueurs de la sénescence ont été mesurés dans les feuilles de plantes *amiRgox1/2* présentant des symptômes de sénescence sur les feuilles âgées après 5 jours de transfert de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air (la quantité de protéines solubles, de RuBisCO, de chlorophylle, et le niveaux de transcrits du gène *SAG12*).

Les résultats démontrent que :

- Les gènes *GOX1* et *GOX2* sont redondants pour la photorespiration chez *A. thaliana*.
- L'inhibition de la photorespiration dans l'air inhibe la photosynthèse, indépendamment du glyoxylate.
- La diminution de l'activité photorespiratoire de la lignée *amiRgox1/2* diminue l'allocation de carbone nouvellement assimilé par la photosynthèse vers les sucres, certains acides organiques du cycle de Krebs et des acides aminés ; 50% du carbone étant bloqué dans le glycolate.
- Quelques jours après leur transfert dans l'air, la faible disponibilité en carbone chez les plantes *amiRgox1/2* induit le déclenchement de la sénescence dans les feuilles de rosettes les plus âgées.

**Les résultats des articles II et III** seront discutés et comparés ensemble dans la **discussion générale**.

## Article II.

**Les mutants photorespiratoires *glutamate:glyoxylate aminotransférase 1* d'*Arabidopsis thaliana* maintiennent une balance carbone/azote constante en réduisant leur quantité de RuBisCO et leur croissance**



# ***Arabidopsis thaliana* ggt1 photorespiratory mutants maintain leaf carbon/nitrogen balance by reducing RuBisCO content and plant growth**

Younès Dello, Marlène Lamothe-Sibold, Mathieu Jossier and Michael Hodges\*

Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, UMR 9213/UMR1403, CNRS/INRA, Université Paris Sud, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Bâtiment 630, Orsay Cedex 91405, France

Received 16 April 2015; accepted 20 July 2015; published online 28 July 2015.

\*For correspondence (e-mail michael.hodges@u-psud.fr).

## SUMMARY

Metabolic and physiological analyses of glutamate:glyoxylate aminotransferase 1 (GGT1) mutants were performed at the global leaf scale to elucidate the mechanisms involved in their photorespiratory growth phenotype. Air-grown *ggt1* mutants showed retarded growth and development, that was not observed at high CO<sub>2</sub> (3000 µL L<sup>-1</sup>). When compared to wild-type (WT) plants, air-grown *ggt1* plants exhibited glyoxylate accumulation, global changes in amino acid amounts including a decrease in serine content, lower organic acid levels, and modified ATP/ADP and NADP<sup>+</sup>/NADPH ratios. When compared to WT plants, their net CO<sub>2</sub> assimilation rates (A<sub>n</sub>) were 50% lower and this mirrored decreases in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) contents. High CO<sub>2</sub>-grown *ggt1* plants transferred to air revealed a rapid decrease of A<sub>n</sub> and photosynthetic electron transfer rate while maintaining a high energetic state. Short-term (a night period and 4 h of light) transferred *ggt1* leaves accumulated glyoxylate and exhibited low serine contents, while other amino acid levels were not modified. RuBisCO content, activity and activation state were not altered after a short-term transfer while the ATP/ADP ratio was lowered in *ggt1* rosettes. However, plant growth and RuBisCO levels were both reduced in *ggt1* leaves after a long-term (12 days) acclimation to air from high CO<sub>2</sub> when compared to WT plants. The data are discussed with respect to a reduced photorespiratory carbon recycling in the mutants. It is proposed that the low A<sub>n</sub> limits nitrogen-assimilation, this decreases leaf RuBisCO content until plants attain a new homeostatic state that maintains a constant C/N balance and leads to smaller, slower growing plants.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, photorespiration, photosynthesis, primary metabolism, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, serine.

## INTRODUCTION

Plants fix atmospheric CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> to produce either 3-phosphoglycerate (3-PGA) or 2-phosphoglycolate (2-PG) by the activity of their ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase/oxygenase (RuBisCO). 3-PGA is used directly by plants as a carbon source for biosynthetic processes, including the regeneration of RuBP by the Calvin cycle. Since 2-PG can inhibit the activity of triose phosphate isomerase (necessary for the functioning of the Calvin cycle) (Anderson, 1971), it is metabolized by the photorespiratory cycle. This metabolic pathway uses eight key enzymes and several transporters located in chloroplasts, peroxisomes, mitochondria and the cytosol. Two RuBisCO oxygenation steps are required to convert two molecules of 2-PG into a molecule of 3-PGA, with the production of one molecule of CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NADH and ADP, 2 molecules of phosphate and

the consumption of an NADH and an ATP (see Bauwe *et al.*, 2010 for a review). Since this C-recycling pathway has an energetic cost, it has become a target for improving plant growth and biomass. Recently, the introduction of metabolic bypasses into the chloroplast has led to promising results with respect to increased biomass (Kebeish *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2012; Nölke *et al.*, 2014). Such approaches were developed because inhibiting the photorespiratory cycle by down-regulating a specific photorespiratory enzyme has negative effects on plant growth.

The first *Arabidopsis thaliana* photorespiratory mutants were isolated by Somerville and co-workers after screening chemically mutagenized seed (e.g. Somerville and Ogren, 1980, 1981, 1982). Since, *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants of each key photorespiratory enzyme have been

isolated and characterized, thus helping to identify the corresponding photorespiratory genes (see Foyer *et al.*, 2009). In ambient air, all photorespiratory mutants are affected in their growth to differing degrees but this is not observed under high CO<sub>2</sub> conditions. Recently, photorespiratory phenotypes have been classified according to the severity of the symptoms: heavy (Class I, no rescue in high CO<sub>2</sub>), strong-to-intermediate (Class II, strong growth phenotype and chlorosis in air, and after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air) and intermediate-to-slight (Class III, only a slight effect on growth in air, and after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air) (see Timm and Bauwe, 2013). Such observations show that the photorespiratory pathway is indispensable for normal plant growth and development. This could reflect the importance of recycling carbon from 2-PG, however photorespiration is also linked to several important metabolic processes such as photosynthesis, nitrogen-assimilation, amino acid biosynthesis, respiration, C<sub>1</sub>-metabolism (see Foyer *et al.*, 2009; Bauwe *et al.*, 2010; Florian *et al.*, 2013). It also produces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (via glycolate oxidase (GO) activity) that is important in stress signaling (Foyer *et al.*, 2009). Indeed, GO mutants with less activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production have been reported to be more sensitive to pathogen attack (Rojas *et al.*, 2012). However, the effect of an altered photorespiratory capacity on plant functions is complex and poorly understood. It has already been demonstrated that net photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation is reduced in *A. thaliana* photorespiratory mutants in air (Chastain and Ogren, 1989; Takahashi *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2012). In certain plant species, elevated CO<sub>2</sub> levels or low O<sub>2</sub> levels that decrease photorespiration also lead to lower nitrate assimilation (Bloom *et al.*, 2010). The short-term increase of photorespiration in leaves of *X. strumarium*, by modifying the CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> contents of air to modulate RuBisCO oxygenase activity, was seen to increase glycolysis and the decarboxylation rate of the TCA cycle (Tcherkez *et al.*, 2008).

An enzyme that links photorespiration to amino and organic acid metabolisms is the glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGT; EC 2.6.1.44) that transfers an amine group from Glu to glyoxylate to produce Gly and 2-oxoglutarate. GGT is encoded by two genes in *A. thaliana*, *GGT1* (At1 g23310) and *GGT2* (At1 g70580), and although they were identified originally as homologs of alanine aminotransferases (AOAT) they show *in vitro* GGT activity, as well as Glu:pyruvate, Ala:pyruvate and Ala:2-oxoglutarate aminotransferase activities (Liepman and Olsen, 2003). *GGT1* (also named AOAT1) was identified as the photorespiratory isoform because *in vitro*-grown *aoat1* knock-down plants exhibited an intermediate-slight (class III) photorespiratory phenotype that was reverted by growth in high CO<sub>2</sub> (Igarashi *et al.*, 2003). The phenotype could be partially reversed by low light conditions or supplementing the growth medium with 3% sucrose. *In vivo*

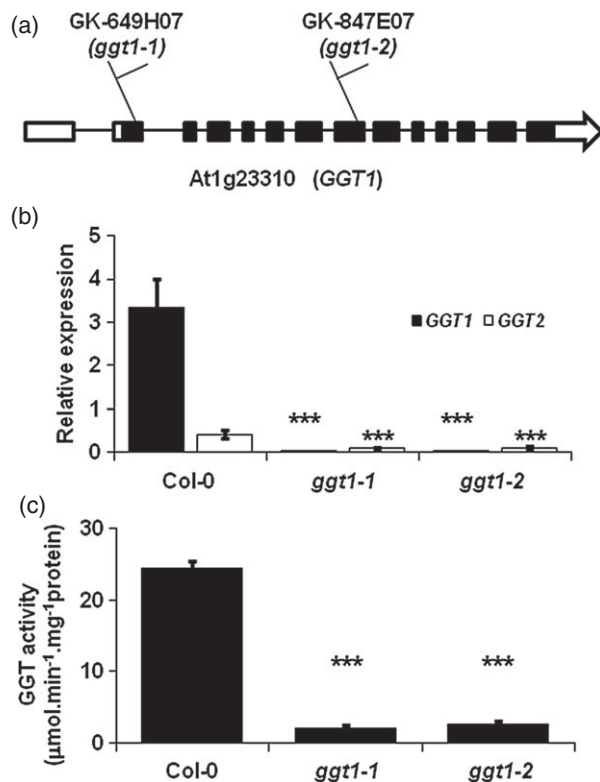
seedling aminotransferase activities of this mutant showed an 80% decrease of Glu:glyoxylate and Ala:glyoxylate aminotransferase activities, and a 40% decrease of Ala:2-oxoglutarate and Glu:pyruvate aminotransferase activities. This mutant also contained modified amino acid levels including lower Ser and higher Glu amounts in leaves of *in vitro*-grown seedlings that were transferred from 24 h darkness to light (Igarashi *et al.*, 2003). Over-expression of *GGT1* (also named *GGAT1*) in *A. thaliana* did not result in any increase of plant biomass and growth, however Ser and Gly contents were highly increased in leaves, stems and siliques and these changes correlated with *GGT1* mRNA levels and activities (Igarashi *et al.*, 2006).

In this work, the interactions between photorespiration, photosynthesis and amino and organic acid metabolisms were investigated by studying two allelic *A. thaliana* *GGT1* mutant lines. Leaf primary metabolism was dissected by metabolic profiling and photosynthetic analyses of both air-grown and high CO<sub>2</sub> to air transferred plants. The results suggest that a low GGT activity limits rosette growth due to a limitation of carbon recycling and a low RuBisCO content that decrease leaf photosynthetic activity and impact both amino and organic acid metabolisms, so as to maintain a constant C/N balance when plants are grown in air. The observations made after transfer from high CO<sub>2</sub> to air give insights into the initial metabolic and physiological changes that occur and allow *ggt1* mutants to acclimate to growth in air.

## RESULTS

### Identification of *ggt1* T-DNA insertion lines

Two *A. thaliana* T-DNA insertion lines for *GGT1* were identified in the GABI-Kat database. Line GK-649H07 (*ggt1-1*) carries a T-DNA insertion in the second exon and line GK-847E07 (*ggt1-2*) has a T-DNA in the eighth exon of the *GGT1* coding sequence (Figure 1a). Homozygous plants for the insertion were PCR-identified. Reverse transcription-PCR of rosette leaf total RNA from air-grown *A. thaliana* Columbia (Col-0) plants confirmed *GGT1* as the major GGT gene expressed in this organ (Figure 1b). Both mutant lines showed >400-fold less *GGT1* transcripts compared to WT plants, indicating that both were indeed *ggt1* knock-out mutants. The absence of *GGT1* did not lead to compensation by *GGT2* since *GGT2* RNA amounts did not increase in *ggt1* leaves. Rosette leaf GGT activity was reduced by >15-fold in the *ggt1* mutants when compared to the WT, consistent with the disruption of *GGT1* in both *ggt1* lines (Figure 1c). The residual GGT activity is probably due to *GGT2*, or other aminotransferases that exhibit low *in planta* GGT activities. Both *ggt1* mutants showed a similar slight (class III) photorespiratory phenotype (see Timm and Bauwe, 2013) since they were viable in air and only



**Figure 1.** Identification of *A. thaliana* *ggt1* mutants.

(a) Localization of each T-DNA insertion in the GABI lines used in this work. Black boxes represent exons, solid lines introns and white boxes 5' and 3' UTR regions of At1g23310 encoding GGT1.

(b) RT-PCR analyses of *GGT1* and *GGT2* transcripts using total RNA from 5-week-old wild type (WT) (Col-0) and *ggt1* rosette leaves. Values are normalized to the expression of *ACTIN2*. Measurements were carried out on four pools of rosette leaves.

(c) Total GGT activities of soluble extracts from six pools of 5-week-old WT and *ggt1* mutant rosette leaves. Values are means  $\pm$  SD. \*\*\*Represents data that are significantly different from the Col-0 values with a Student's *t*-test ( $P < 0.001$ ).

exhibited reduced growth in air that was not seen when they were grown in high  $\text{CO}_2$  (Figure 2a). However, their fresh weight/dry weight ratios were unchanged compared to WT plants (Figure S1) while differences in rosette diameter and leaf number (Figure 2b,c) between *ggt1* and WT plants clearly indicated the slower growth and development of both mutants in air.

#### ***ggt1* mutants exhibit altered metabolite levels but the C/N ratio is unchanged in air-grown plants**

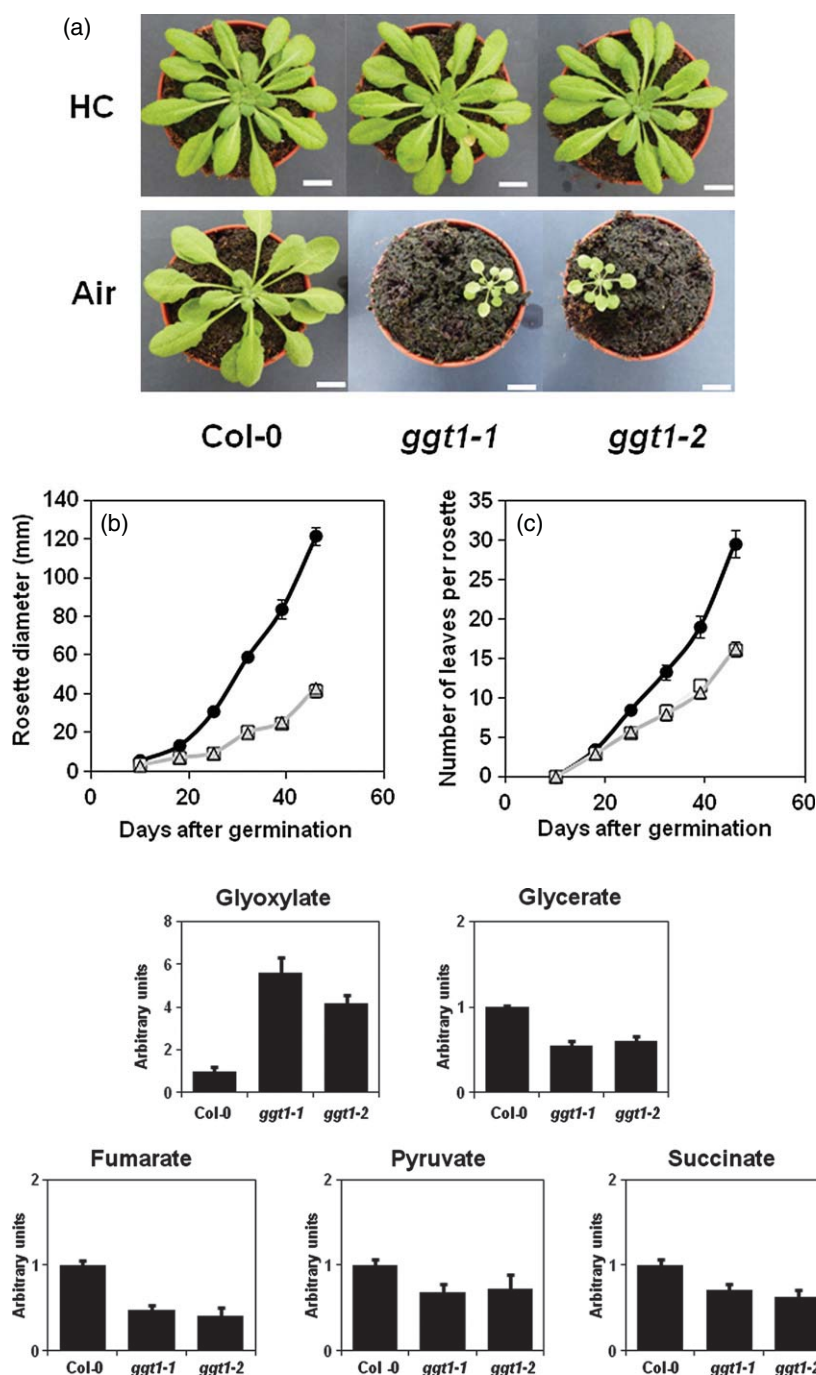
To ensure that the observed phenotype in air resulted from a disruption of the photorespiratory pathway and to see if this perturbation affected metabolite levels of other metabolic functions, non-targeted metabolite analyses by GC-MS (Figure 3 and Table S1) and quantitative high pressure liquid chromatography (HPLC) (for amino acids, Figure 4) were carried out using 5-week-old air-grown

rosette leaves of WT and both *ggt1* mutants. A five-fold increase in glyoxylate was detected in *ggt1* leaves, compared to the control (Figure 3). This finding suggested that photorespiration was indeed blocked by the reduced GGT activity in both mutants. Furthermore, there was a decrease in Ser and glycerate levels; both produced downstream from GGT in the photorespiratory cycle (Figures 3 and 4 and Table S1). Perhaps surprisingly, Gly accumulated slightly in the *ggt1* mutants (Figure 4 and Table S1). Several organic acids associated with the TCA cycle (fumarate, succinate and pyruvate) were found to decrease significantly by 1.5- to 2-fold in *ggt1* leaves (Figure 3) compared with the control while others (citrate and malate) remained unchanged (Table S1). Our non-targeted GS-MS analyses also revealed a number of other metabolite levels that were modified in both mutants compared to the WT including increases in nicotinate, phosphate, putrescine and tyramine while *myo*-inositol decreased (Table S1). Quantitative amino acid analyses revealed a global increase of leaf soluble amino acid content in the *ggt1* mutants, but there were contrasted changes in individual amino acids (Figure 4). Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Val, GABA, Ile, Leu, Lys, Met, and Orn were seen to accumulate very slightly albeit significantly in both mutant lines compared with the WT, while only Ser and Thr decreased; perhaps reflecting a weak perturbation of overall amino acid metabolism (Figure 4a,b).

Analysis of leaf total carbon and nitrogen contents revealed no differences between the mutant and WT rosettes, except for a slight but significant decrease in *ggt1-1* N content. However, the leaf C/N ratio remained unchanged in the small air-grown *ggt1* plants when compared to the larger WT Col-0 plants as did nitrate and ammonium levels (Table 1). The leaves of *ggt1* mutants accumulated 35% less starch and 58% less soluble glucose at the end the day (Table 1). Total chlorophyll (chl) contents did not differ however the  $\text{Chl}_a/\text{Chl}_b$  ratio was significantly lower in both *ggt1* mutants compared to the WT. Pyridine nucleotides, and ATP and ADP contents were also measured in the different plant lines. The mutants accumulated more NADPH and less  $\text{NADP}^+$  compared to the WT while  $\text{NAD}^+$  and NADH levels did not change (Table 1). The ATP/ADP ratio also decreased in *ggt1* leaves due to the decrease of ATP levels and an increase of ADP content (Table 1).

#### **Reduction of photosynthesis in air-grown *ggt1* mutants is independent of RuBisCO activation state**

The retarded growth phenotype and the reduced starch and glucose contents of the *ggt1* plants suggested that their photosynthetic capacity might be affected. Therefore, net  $\text{CO}_2$  assimilation rates ( $A_n$ ) were measured using a home-built chamber adapted for whole plants and linked



**Figure 2.** Growth phenotype of *ggt1* mutants.

(a) Five-week-old wild type (WT) (Col-0) and *ggt1* plants grown under short days in either high CO<sub>2</sub> (HC) or air. White bar = 1 cm.

(b) Rosette diameter and (c) number of leaves per rosette of *ggt1-1* (white squares), *ggt1-2* (grey triangles) and WT (black circles) plants grown under short days in air. Bars represent the standard deviation (SD) ( $n = 5$ ).

**Figure 3.** Significantly different relative leaf metabolite levels between air-grown wild type (WT) and *ggt1* rosettes.

Relative metabolite contents (mean  $\pm$  standard deviation (SD)) are shown with the corresponding WT (Col-0) content set to 1. Bars represent the SD of three pools of 5-week-old mutant and WT leaves. All values are significantly different from the control experiment for both mutants (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Complete GC-MS metabolite analyses are available in Table S1.

to an infra-red gas analyzer. It was found that *ggt1* rosettes had a 45% lower  $A_n$  compared with the WT (Figure 5a). *In vitro* leaf RuBisCO activities normalized to leaf surface (to allow a comparison with the gas-exchange measurements) showed *ggt1* extracts contained significantly lower initial and total activities, but control and mutant lines exhibited similar RuBisCO activation states (Figure 5b,c). Indeed, the differences in RuBisCO activity was due to lower RuBisCO protein amounts per leaf surface in *ggt1* mutant leaves, as seen by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel elec-

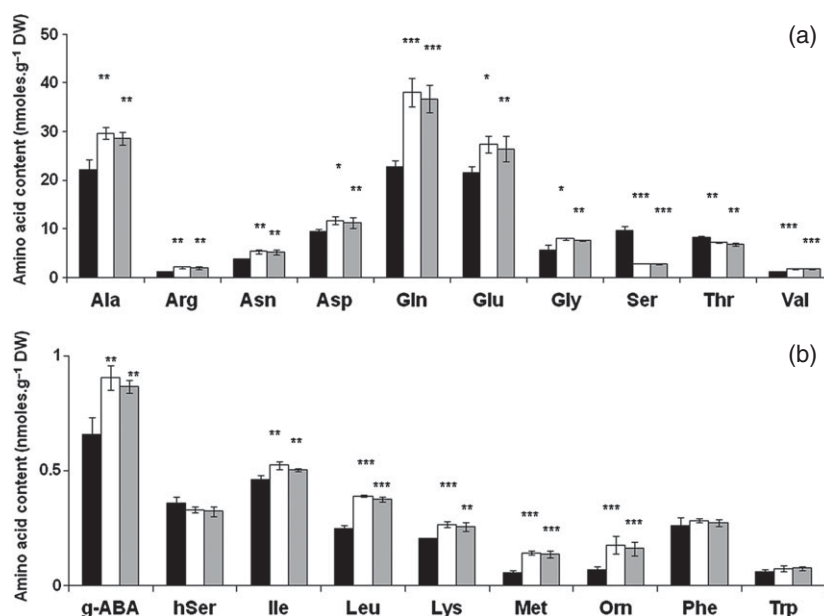
trophoresis (SDS-PAGE) (Figure 5d). Such differences in RuBisCO activity would help explain the lower  $A_n$  between the WT and mutant rosettes (Figure 5a).

#### Physiological and metabolic analyses of plants transferred from high CO<sub>2</sub> conditions (non-photorespiratory) to air (photorespiratory)

In an attempt to better understand the initial changes that could have led to the air-grown photorespiratory phenotype of the *ggt1* plants it was decided to investigate the



**Figure 4.** Soluble amino acid contents of air-grown *ggt1* and wild type (WT) rosettes. Leaves of *ggt1* and WT plants were sampled under the light at the middle of the day and free amino acids were extracted and separated by HPLC. (a) Major and (b) minor amino acid contents of WT (black), *ggt1-1* (white) and *ggt1-2* (grey) leaves. Values are means  $\pm$  standard deviation (SD) of three pools of leaves. Significantly different values from the WT are denoted (Student's *t*-test; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001).



physiological and metabolic properties of plants transferred from high CO<sub>2</sub> (3000  $\mu$ L L<sup>-1</sup> for 6 weeks) to air. Gas-exchange and chlorophyll fluorescence measurements were carried out on fully expanded leaves of plants transferred to air from high CO<sub>2</sub> conditions for a complete 16 h night period before undertaking the analyses. Before transfer, all high CO<sub>2</sub> grown plants (Col-0, *ggt1-1* and *ggt1-2*) had similar A<sub>n</sub>, dark respiration, transpiration rate, stomatal conductance, non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and photosynthetic electron transfer rate (ETR) values (Table S2). However, after transfer, *ggt1* leaves exhibited a steady decrease in A<sub>n</sub> before reaching a stationary level that was 40% lower than WT rosettes after several hours (Figure 6a and Table 2). Interestingly, NPQ showed anti-parallel changes compared to A<sub>n</sub>, with NPQ rapidly decreasing in WT leaves while remaining high in mutant rosettes (Figure 6b). The calculated ETR followed the same behavior as A<sub>n</sub> (compare Figure 6c with Figure 6a). No differences were observed for leaf transpiration, stomatal CO<sub>2</sub> conductance and dark respiratory CO<sub>2</sub> release between WT and *ggt1* plants after their transfer to air (Table 2). When plants were placed in the dark after the light treatment, a similar rapid (10 min) dark-reversion of F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>' was observed (Figure 6d). Taken together, these results suggest that photosynthesis is becoming progressively inhibited in *ggt1* mutants during the light period, as both CO<sub>2</sub> assimilation and photosynthetic electron transfer to NADP<sup>+</sup> decrease rapidly (Figure 6).

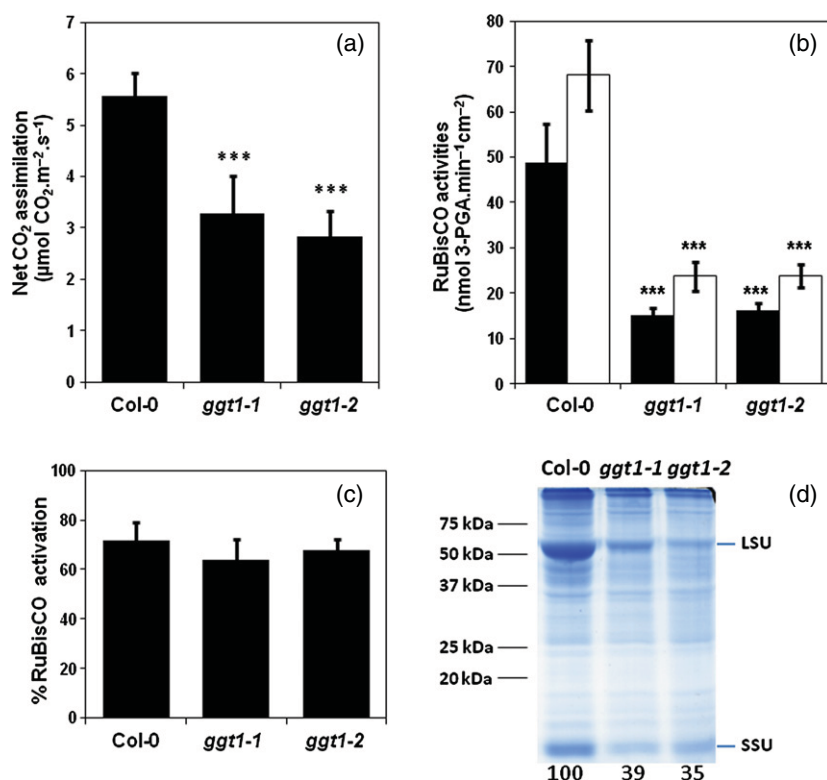
After *ggt1* mutants had attained a photosynthetic stationary-state, A<sub>n</sub> versus CO<sub>2</sub> and A<sub>n</sub> versus light intensity response curves, and the measurement of the post illumination burst (PIB) were carried out to fully characterize

**Table 1** Leaf carbon, nitrogen, pyridine nucleotides, ATP and ADP contents of air-grown WT (Col-0) and *ggt1* rosettes

	Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>
Total carbon (%)	35.21 $\pm$ 1.09	34.13 $\pm$ 1.94	34.24 $\pm$ 1.18
Total nitrogen (%)	6.6 $\pm$ 0.16	6.28 $\pm$ 0.16	6.48 $\pm$ 0.22
Glucose	0.83 $\pm$ 0.20	0.35 $\pm$ 0.08	0.35 $\pm$ 0.10
Starch	67.50 $\pm$ 11.50	43.77 $\pm$ 11.51	43.89 $\pm$ 10.20
Nitrate	81.79 $\pm$ 5.93	75.04 $\pm$ 7.23	79.89 $\pm$ 6.10
Ammonia	30.04 $\pm$ 4.12	32.46 $\pm$ 2.68	33.57 $\pm$ 3.67
Total Chl	1.33 $\pm$ 0.20	1.39 $\pm$ 0.26	1.43 $\pm$ 0.16
NAD <sup>+</sup>	15.86 $\pm$ 1.67	19.99 $\pm$ 2.89	20.25 $\pm$ 2.13
NADH	1.56 $\pm$ 0.76	1.76 $\pm$ 0.22	2.17 $\pm$ 1.19
NADP <sup>+</sup>	8.98 $\pm$ 1.40	7.25 $\pm$ 1.20	7.06 $\pm$ 1.41
NADPH	3.41 $\pm$ 0.79	4.50 $\pm$ 0.71	4.42 $\pm$ 0.61
ATP	137.5 $\pm$ 49.49	70.06 $\pm$ 12.83	73.62 $\pm$ 14.43
ADP	80.10 $\pm$ 16.48	123.61 $\pm$ 32.62	120.93 $\pm$ 22.85
Total C/Total N	5.33 $\pm$ 0.1	5.44 $\pm$ 0.33	5.29 $\pm$ 0.13
Chl a/Chl b	2.46 $\pm$ 0.44	1.85 $\pm$ 0.67	1.87 $\pm$ 0.59
NADH/NAD <sup>+</sup>	0.10 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.03
NADPH/NADP <sup>+</sup>	0.38 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.09
ATP/ADP	1.68 $\pm$ 0.32	0.62 $\pm$ 0.25	0.65 $\pm$ 0.25

Assays were carried out using 5-week-old air-grown rosette leaves harvested at the middle of the photoperiod, except for soluble glucose and starch contents (harvested at the end of the day). Values are the means  $\pm$  SD. Significantly different values from the Col-0 data are in bold (Student's *t*-test, *P* < 0.05). Total C and N (*n* = 9); Glucose and starch (*n* = 18); Nitrate and ammonium (*n* = 18); Chl (*n* = 12); Pyridine nucleotides, ATP and ADP (*n* = 6). Glucose, nitrate and ammonium,  $\mu$ mol g<sup>-1</sup> FW; starch,  $\mu$ mol glucose g<sup>-1</sup> FW; total chlorophyll, mg g<sup>-1</sup> FW; pyridine nucleotide, ATP and ADP contents, nmoles g<sup>-1</sup> FW.

their CO<sub>2</sub> assimilatory/photorespiratory properties. The CO<sub>2</sub> response curve of *ggt1* plants compared to WT leaves showed that A<sub>n</sub> was always lower in the *ggt1* leaves (espe-



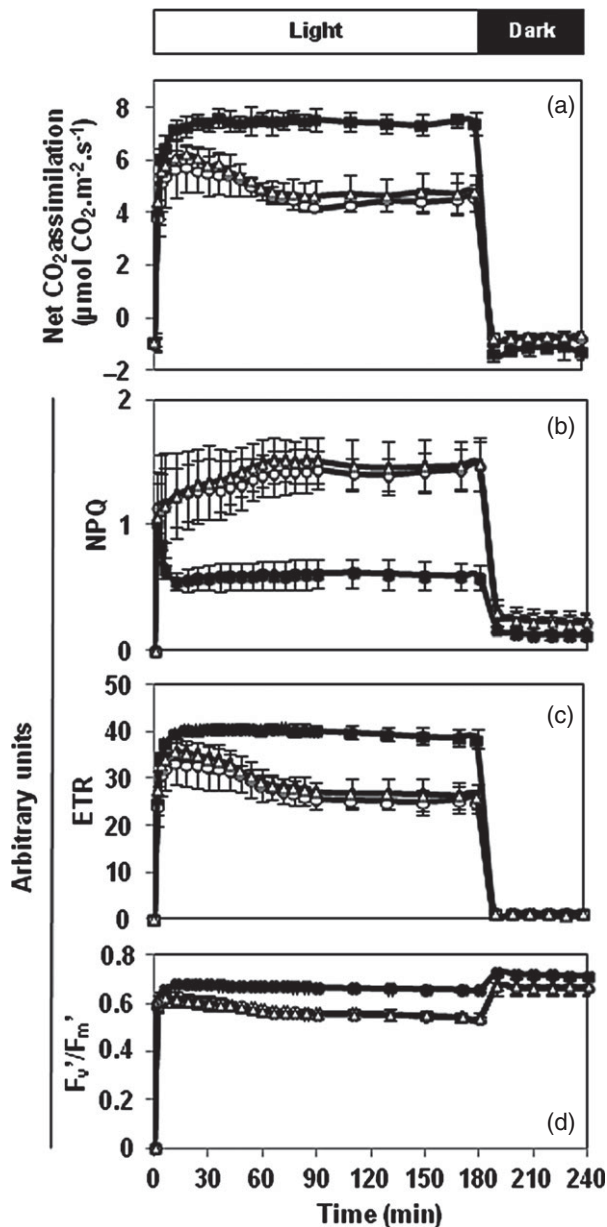
**Figure 5.** Net CO<sub>2</sub> assimilation and RuBisCO properties of air-grown wild type (WT) and *ggt1* leaves. (a) Steady-state net CO<sub>2</sub> assimilation of WT (Col-0) and *ggt1* plants (at a light intensity of 200 μmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>). (b) Initial (black) and total (white) RuBisCO activities. (c) RuBisCO activation state (calculated from the initial/total activity ratio). (d) SDS-PAGE gel showing the large (LSU) and small (SSU) RuBisCO subunits of total soluble proteins extracted from an identical leaf area (0.15 cm<sup>2</sup>), with the corresponding intensity values for LSU relative to the WT (Col-0) normalized to 100. Values are means ± SD of either five independent plants (gas exchange) or six pools of mutant and Col-0 leaves (for activities and SDS-PAGE). Significantly different values from the WT are denoted (\*\*\*, Student's *t*-test *P* < 0.001).

cially at 380 μL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> of air) although a much smaller difference was observed in the presence of 1000 μL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> of air (Figure S2a). The linear part of such curves (C<sub>i</sub> range between 50 and 300 μL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> of air) was used to calculate the CO<sub>2</sub> compensation point that was two-fold higher in the *ggt1* mutants compared to WT plants (Table 2). The A<sub>n</sub> versus light response curves of *ggt1* mutants showed that A<sub>n</sub> was not affected at low, limiting light intensities (< 50 μmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) but the mutants progressively showed an enhanced inhibition of A<sub>n</sub> as light intensity increased and CO<sub>2</sub> and/or RuBP recycling became limiting. At a light intensity >500 μmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>, A<sub>n</sub> was nearly saturated and remained two-fold lower in both *ggt1* mutants compared to WT rosettes (Figure S2b). To ensure that photorespiration was effectively affected in the *ggt1* mutants after transfer to air, their PIB was measured. This corresponds to a continued glycine decarboxylase activity after switching off the light due to certain metabolites still being engaged in the photorespiratory pathway (Laiss and Sumberg, 1994; Kebeish *et al.*, 2007). Thus, the reduced PIB value exhibited by the *ggt1* mutants compared to WT plants (Table 2) reflects the lower photorespiratory cycle activity of these mutants. Taken together, our observations are in good agreement with a gradual inhibition of photosynthetic activity in the light when the photorespiratory cycle is inhibited in *ggt1* leaves.

It has been reported that certain photorespiratory metabolites can directly inhibit RuBisCO activity (Ander-

son, 1971; Lu *et al.*, 2013). Therefore, non-targeted GC-MS metabolite analyses of fully expanded rosettes leaves of WT and *ggt1* mutants were carried out before (plants in high CO<sub>2</sub>) and after a short-term transfer to air (16 h night and 4 h day treatment) to reduce A<sub>n</sub> in the *ggt1* leaves (Figure 7 and Table S3). As expected, a high increase of glyoxylate content (9 to 10-fold) was seen only in the transferred *ggt1* mutants (Figure 7), confirming that their photorespiratory cycle was rapidly blocked. Surprisingly, Ser content was already reduced in *ggt1* leaves before transfer to air, while decreasing further after transfer (Figure 7). Alanine and Thr were seen to decrease in both *ggt1* mutants after the transfer compared to WT plants (Table S3). Glycine was increased seven-fold in WT plants after transfer to air when compared to high CO<sub>2</sub> WT plants however it only increased two-fold in both *ggt1* mutants (Table S3). After a short-term transfer, the mutants did not show any differences in TCA cycle organic acids when compared to the WT (Table S3).

After the short-term transfer to air, photorespiration was reduced in the *ggt1* mutants, and this was accompanied by a decrease of A<sub>n</sub> and photosynthetic ETR (Figure 6). The inhibition of net CO<sub>2</sub> assimilation could be a consequence of a direct inhibition of the RuBisCO by a photorespiratory product that accumulated in the mutant (perhaps glyoxylate in our case; Figure 7), or an inhibition of the Calvin cycle due to low ATP and NADPH levels that would impact negatively RuBP recycling to maintain RuBisCO



**Figure 6.** Changes in net CO<sub>2</sub> assimilation rates and chlorophyll fluorescence parameters of WT and *ggt1* rosettes after transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

(a) Net CO<sub>2</sub> assimilation rate, (b) non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQ), (c) photosynthetic electron transfer rate (ETR) and (d)  $F_v'/F_m'$  ratio values of WT (black squares), *ggt1-1* (white circles) and *ggt1-2* (white triangles) plants grown during 6 weeks in high CO<sub>2</sub> and transferred to air at the start of the night period prior to measurements the next day. Before each measurement, plants were dark-adapted for 1 h before measurements were made. Values are means  $\pm$  standard deviation (SD) for three plants.

activity. Therefore, RuBisCO activities, and pyridine nucleotides, ATP and ADP contents were measured in leaf extracts before and after a short-term transfer to air. RuBisCO activities were not significantly different between *ggt1-1* and WT plants when compared either before or

after this transfer, while *ggt1-2* plants always exhibited lower activities. However, slightly higher activities were seen in all transferred lines (Table 3). Furthermore, RuBisCO activation state remained constant (around 80%) for each plant line and condition (Table 3). RuBisCO amounts per leaf area were also found not to be different before and after the short-term transfer (Figure S4a), unlike in the small air-grown *ggt1* plants. No significant differences of NAD<sup>+</sup>, NADH and NADPH contents were seen between WT and mutant leaf extracts, however slight fluctuations of NADP<sup>+</sup> levels were observed after transfer (Table 3) although NADP<sup>+</sup>/NADPH ratios remained unchanged (Table 3). No differences were observed in ATP and ADP levels before transfer to air, but lower ATP and higher ADP levels were observed in the *ggt1* mutants compared to WT leaves after transfer to air; such changes reduced the ATP/ADP ratio of *ggt1* rosettes (Table 3).

It was decided to carry out a longer-term acclimation of the high CO<sub>2</sub> plants to air to see if *ggt1* plants became affected in their growth when compared to WT plants and whether this was associated with an altered leaf RuBisCO content (Figures 8 and S3). Leaf rosette diameter was measured during a 12 day period after transfer to air and RuBisCO levels were estimated per leaf by SDS-PAGE (Figure 8). It can be seen that several days after their transfer to air, *ggt1* rosette growth became reduced compared to the Col-0 plants (by approx. two-fold, Figure 8b) and this coincided with lower RuBisCO amounts per leaf area in the mutants (Figures 8(c) and S3b). Indeed, after transfer, RuBisCO per leaf area increased by approximately two-fold in WT plants while a significantly lower increase was observed for mutant leaves. It appears that *ggt1* leaves cannot fully acclimate to a transfer from high CO<sub>2</sub> to air and this leads to a slower growth that is associated with lower amounts of RuBisCO in their leaves.

## DISCUSSION

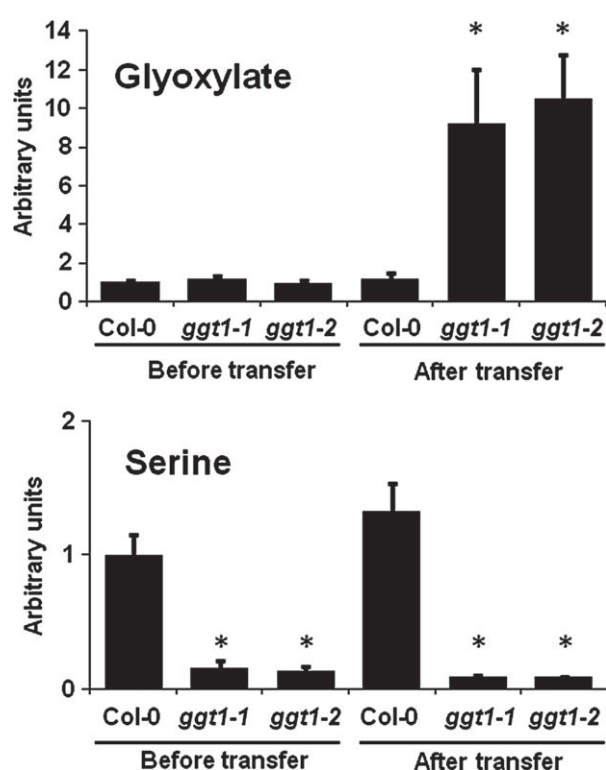
### The air-grown *ggt1* growth phenotype is due to a reduced $A_n$ and less RuBisCO per leaf area

Two new mutant alleles for *A. thaliana* *GGT1* (Figure 1) have been characterized that exhibit a weak photorespiratory phenotype. To understand the processes underlying this phenotype, the metabolic and gas-exchange properties of air-grown mutants were compared with plants transferred from high CO<sub>2</sub> to air. Indeed, air-grown *ggt1* plants showed alterations in growth and development that led to smaller rosette leaves and a 10-day difference to obtain the same leaf number between 5-week-old WT and mutant plants. As expected for a photorespiratory phenotype, growth differences were not seen when plants were grown under high CO<sub>2</sub> conditions (Figure 2). Based on the growth phenotype and an absence of chlorosis, *ggt1* mutants show an intermediate-to-slight photorespiratory (class III)

**Table 2** Physiological parameters of WT (Col-0) and *ggt1* rosettes after a short-term transfer to air

	Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>
$A_n$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ )	$7.38 \pm 0.44$	<b><math>4.55 \pm 0.51</math></b>	<b><math>4.75 \pm 0.69</math></b>
$R_{\text{dark}}$ ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ )	$-0.77 \pm 0.25$	$-0.81 \pm 0.07$	$-1.01 \pm 0.32$
PIB ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ )	$1.16 \pm 0.14$	<b><math>0.79 \pm 0.11</math></b>	<b><math>0.88 \pm 0.09</math></b>
CO <sub>2</sub> compensation point ( $\mu\text{L CO}_2 \text{ L}^{-1}$ )	$51.17 \pm 4.12$	<b><math>101.88 \pm 11.05</math></b>	<b><math>88.24 \pm 12.33</math></b>
Day transpiration ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ )	$1.26 \pm 0.07$	$1.34 \pm 0.18$	$1.36 \pm 0.17$
Stomatal conductance ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ )	$0.134 \pm 0.012$	$0.144 \pm 0.0131$	$0.146 \pm 0.0221$

Net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ), dark respiration rate ( $R_{\text{dark}}$ ), post illumination burst (PIB), CO<sub>2</sub> compensation point, day transpiration and stomatal conductance of WT and *ggt1* rosettes grown during 6 weeks in high CO<sub>2</sub> and transferred to air for a night before carrying out measurements. WT and *ggt1* plants were taken the following day and values were measured after 1 h illumination. Values are means  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 3$  for  $A_n$ ,  $R_{\text{dark}}$ , day respiration and stomatal conductance;  $n = 6$  for PIB and CO<sub>2</sub> compensation point). Values in bold are significantly different from Col-0 (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).



**Figure 7.** Serine and glyoxylate levels of wild type (WT) and *ggt1* rosettes before and after a short-term transfer from high CO<sub>2</sub> to air. Plants were harvested before (at high CO<sub>2</sub>, middle of the light period) and after transfer to air (1 night and 4 h of light). Only serine and glyoxylate levels exhibited significant differences in both *ggt1* lines compared to the WT (Col-0). Relative metabolite contents are shown with the corresponding WT content under high CO<sub>2</sub> set to 1. Values are means  $\pm$  standard deviation (SD) for three pools of plants. Significantly different *ggt1* values compared with Col-0 before and after transfer are indicated by \*Student's *t*-test,  $P < 0.05$ . Complete GC-MS metabolite analyses are available in Table S2.

phenotype similar to *hpr1* (see Timm *et al.*, 2012; Timm and Bauwe, 2013). The small air-grown *ggt1* plants had lower net CO<sub>2</sub> assimilation rates ( $A_n$ ) in the light (Figure 5), which could be a major factor in the delayed growth

(Figure 2). Several reasons can explain this low  $A_n$  including altered stomatal properties that reduce leaf CO<sub>2</sub> concentration, impaired RuBP regeneration, lower RuBisCO activation state and decreased RuBisCO protein levels. Previous analyses of another *ggt1* allele showed that the photorespiratory growth phenotype could be reverted by the addition of 3% sucrose to *in vitro*-grown mutant plantlets, suggesting that it was due to a C-limitation (Igarashi *et al.*, 2003). In this work, WT and *ggt1* plants showed several differences that could explain the low  $A_n$ . First, the accumulation of glyoxylate in the mutants (Figure 3) could affect  $A_n$  since this photorespiratory metabolite has been shown to inhibit RuBisCO light activation in isolated chloroplasts (Campbell and Ogren, 1990) and the activity of purified spinach RuBisCO (Cook *et al.*, 1985). In contrast, glyoxylate appeared to inhibit RuBP regeneration without affecting RuBisCO activation and activity in spinach chloroplasts (Mulligan *et al.*, 1983). In *A. thaliana*, a correlation has been made between glyoxylate accumulation and the  $A_n$  decrease of several photorespiratory mutants (previously named *stm*, *dct*, *glyD*, *gluS*, *sat*) in 50% O<sub>2</sub>-air in the light that was attributed to either a decrease in RuBisCO activation or reduced RuBP regeneration or both depending on the mutant (Chastain and Ogren, 1989). Recently, the analysis of air-grown rice plants with reduced GO activities exhibiting a lower  $A_n$  was attributed to a reduced RuBisCO activation state (Xu *et al.*, 2009) and correlated with unexpected high glyoxylate levels (Lu *et al.*, 2013). In our work, no changes in RuBisCO activation state were found in air-grown *ggt1* plants compared to the WT (Figure 5). Conversely, both RuBisCO activity and content per leaf surface were three-fold lower in air-grown *ggt1* leaves compared to WT rosettes (Figure 5). Interestingly, an *A. thaliana rbsc1a3b-1* mutant deficient in two RuBisCO small subunit isoforms showed a delayed growth similar to *ggt1* that was associated with leaves containing 30% WT RuBisCO amounts and a three-fold lower  $A_n$ , without any modification in stomatal conductance (Izumi *et al.*, 2012). Similar changes were found also in anti-sensed *rbscS*



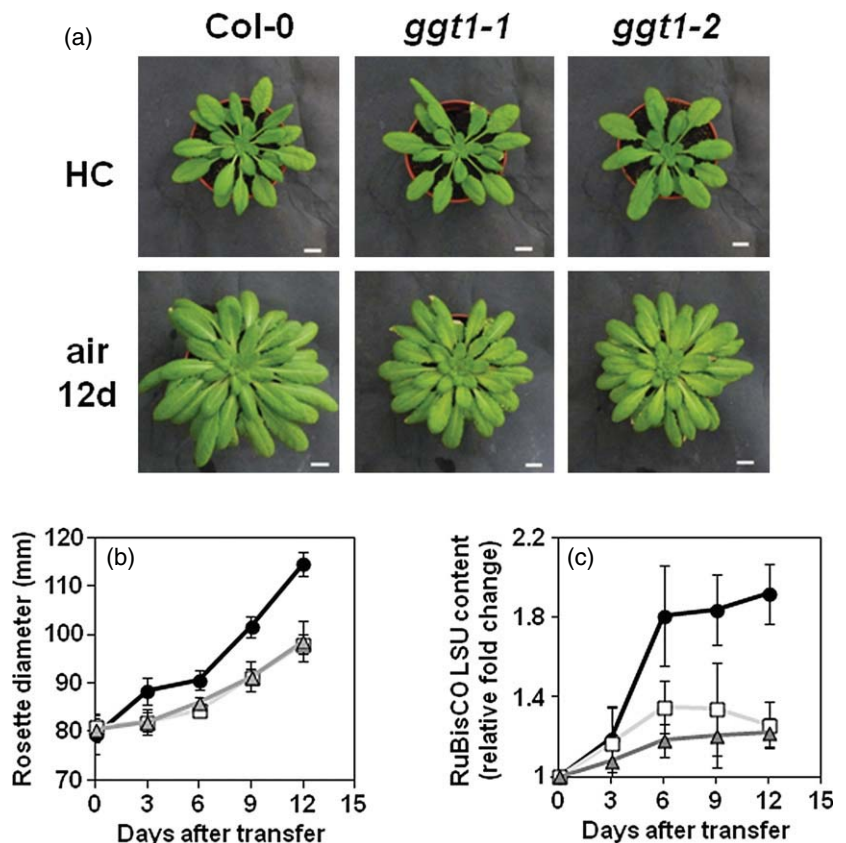
**Table 3** RuBisCO activities, and pyridine nucleotide, ATP and ADP contents of WT and *ggt1* leaves before and after a short-term transfer from high CO<sub>2</sub> to air

	Before transfer			After transfer		
	Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>	Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>
Initial RuBisCO activity	21.87 ± 4.01	18.18 ± 1.95	<b>15.7 ± 1.06</b>	32.21 ± 7.79	25.51 ± 3.7	<b>21.88 ± 3.01</b>
Total RuBisCO activity	25.86 ± 3.57	23.31 ± 1.93	<b>19.03 ± 2.03</b>	38.75 ± 6.1	32.12 ± 4.37	<b>27.5 ± 1.98</b>
RuBisCO activation (%)	84.33 ± 7.2	78.02 ± 5.65	82.95 ± 6.09	82.48 ± 9.26	79.52 ± 5.52	79.41 ± 7.36
NAD <sup>+</sup>	14.16 ± 3.36	15.73 ± 1.21	13.92 ± 2.98	16.07 ± 4.41	18.64 ± 4.81	18.95 ± 4.24
NADH	0.77 ± 0.36	0.80 ± 0.16	0.98 ± 0.40	1.40 ± 0.31	1.21 ± 0.50	1.41 ± 0.42
NADP <sup>+</sup>	7.14 ± 1.30	7.31 ± 1.48	6.86 ± 1.54	9.60 ± 1.95	<b>6.70 ± 1.04</b>	<b>7.51 ± 1.17</b>
NADPH	6.35 ± 2.19	5.68 ± 1.66	7.12 ± 1.81	8.46 ± 2.60	6.23 ± 1.16	7.48 ± 1.51
ATP	232.8 ± 50.2	193.6 ± 70.1	236.0 ± 88.3	341.7 ± 57.9	<b>222.3 ± 96.5</b>	<b>273.4 ± 32.0</b>
ADP	167.3 ± 56.2	184.5 ± 107.5	174.4 ± 62.5	98.8 ± 45.0	<b>181.8 ± 47.2</b>	151.6 ± 43.5
NADH/NAD <sup>+</sup>	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.04
NADPH/NADP <sup>+</sup>	0.91 ± 0.36	0.84 ± 0.46	1.11 ± 0.44	0.91 ± 0.32	0.95 ± 0.19	1.00 ± 0.17
ATP/ADP	1.60 ± 0.94	1.29 ± 0.75	1.54 ± 0.82	3.88 ± 1.26	<b>1.39 ± 1.02</b>	<b>1.90 ± 0.47</b>

Assays were made on rosette leaf extracts of plants grown in high CO<sub>2</sub> for 6 weeks prior to transfer to air for a night before harvesting the leaves at the middle of the following day. Values are means ± standard deviation (SD) ( $n = 6$ ). Significantly different values from Col-0 are in bold (Student's  $t$ -test,  $P < 0.05$ ). RuBisCO activities, nmoles 3-PGA min<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup>; pyridine nucleotide, ATP and ADP contents, nmoles g<sup>-1</sup> FW.

**Figure 8.** Growth phenotype and RuBisCO large subunit amounts during a long-term transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

Twelve days after transfer to air (12 days) from high CO<sub>2</sub> (HC), *ggt1* rosettes showed reduced growth compared to WT rosettes (a). Changes in rosette diameter (b) and RuBisCO large subunit (LSU) contents (c) were measured before (0) and after transfer to air (3, 6, 9 and 12 days). RuBisCO amounts are relative to the 0-day values for each plant line.



tobacco plants containing less RuBisCO, although RuBisCO activity had to decrease below 60% before growth phenotypes occurred. At around 65% inhibition, the plants showed a 50% inhibition of  $A_n$ , reduced biomass and leaf

size and no change in C/N ratio (Quick *et al.*, 1991). In rice, RuBisCO anti-sensed lines with 30% WT RuBisCO content per leaf surface also showed a decrease in  $A_n$  and relative growth rate (Sudo *et al.*, 2014). These observations clearly

suggest that the lower amount of RuBisCO per leaf surface is responsible for the lower  $A_n$  and reduced growth of air-grown *ggt1* mutants. Reduced RuBisCO levels can explain also the 40% decrease in total soluble leaf protein content per surface in the mutants (calculated from Figure S1).

#### **Low RuBisCO amounts and an inhibited photorespiratory cycle have a significant impact on primary metabolism of air-grown *ggt1* plants**

The reduction in starch and glucose at the end of the day probably reflects a limitation in C-assimilation (due to the low  $A_n$  and RuBisCO content) and/or photorespiratory C-recycling (due to the *ggt1* mutation). However, similar results were observed for starch and sucrose contents of rice leaves with less RuBisCO (Sudo *et al.*, 2014) perhaps suggesting that our changes are due to the decreased  $A_n$ . In addition, *ggt1* mutants showed lower TCA cycle-related organic acids (pyruvate, fumarate and succinate), perhaps indicating a reallocation of carbon due to a long-term adaption response to the low C-assimilation rate since such changes were not observed in the short-term transferred plants (Figure 3 and Table S2). A reduced TCA cycle activity would impact respiratory ATP synthesis due to a lower mitochondrial NADH production that could explain, in part, the reduction in the ATP/ADP ratio observed in air-grown *ggt1* rosettes (Table 1). Less ATP in the mutants might also reflect a lower chloroplastic ATPase activity since anti-sensed tobacco lines for this enzyme show a low  $A_n$  associated with high NPQ values (Rott *et al.*, 2011). However, the rosette leaves of WT and air-grown mutants showed no differences in NPQ (Figure S4). It is probable that the lower ATP/ADP and NADP<sup>+</sup>/NADPH ratios of the *ggt1* leaves reflect the long-term acclimation of plant metabolism to the low  $A_n$ .

Some of the observed metabolite changes in the air-grown plants could be associated easily with the reduced GGT activity. The substrates of this aminotransferase were both affected; glyoxylate accumulated several fold while Glu increased significantly (Figures 3 and 4 and Table S1). Alanine levels were increased in *ggt1* leaves and this could reflect the Ala:glyoxylate aminotransferase activity of GGT (Igarashi *et al.*, 2003). However, higher Ala and lower pyruvate levels could be due to a modified C-allocation towards certain amino acid biosynthetic pathways. A reduction of photorespiratory metabolites downstream of the mutation (Ser and glycerate) was also observed (Figures 3 and 4 and Table S1). Surprisingly, Gly content increased slightly (Figure 4 and Table S1) thus suggesting the involvement of non-photorespiratory pathways to maintain Gly levels in the air-grown mutants. Perhaps *in vivo* Ser:glyoxylate aminotransferase (SGAT) activity was increased compared with the WT due to high glyoxylate levels, thus decreasing Ser content to produce Gly. It is possible also to produce Gly from Thr via threonine aldolase (THA). *A. thaliana*

mutants of *THA1* and *THA2* show an increase in leaf Thr content and a decrease in Gly and Ile contents (Joshi *et al.*, 2006) and similar changes were observed in the *ggt1* mutants (Figure 4 and Table S1). Glycine can also be produced from Ser by mitochondrial or non-mitochondrial SHMT activities (Bauwe and Kolukisaoğlu, 2003), while Ser can be produced by non-photorespiratory pathways from 3-PGA (Ros *et al.*, 2014). The low Ser levels and slightly increased Gly levels in *ggt1* leaves could highlight the importance of maintaining Ser-Gly recycling for C<sub>1</sub> metabolism and the multitude of linked biosynthetic reactions including Met biosynthesis (it should be noted that Met levels were doubled in the *ggt1* plants compared with the WT, see Figure 4). Indeed, Gly decarboxylase P-protein mutants are lethal and they cannot be recovered in high CO<sub>2</sub> thus indicating the importance of Ser-Gly cycling (Engel *et al.*, 2007). In general, *ggt1* leaves contained higher soluble amino acid levels (on a dry weight basis) therefore indicating a modification of amino acid metabolism in air-grown *ggt1* plants. That said, both nitrate and ammonia pools were not seen to change (Table 1) even though low photorespiratory conditions have been reported to inhibit nitrate uptake and assimilation in *A. thaliana* (Rachmilevitch *et al.*, 2004; Bloom *et al.*, 2010). Perhaps, the observed changes reflect the lower amounts of protein in the mutants (Figure S1) thus leading to a general increase in soluble amino acid levels (Figure 4). Albeit the metabolic differences between *ggt1* and WT leaves, leaf C/N ratio was not altered in 5-week-old air-grown plants (Table 1). It appears that *ggt1* plants have acclimated their growth, development and metabolism to maintain C/N homeostasis. This was also seen for tobacco plants with similar low RuBisCO levels (Quick *et al.*, 1991). In order to try to decipher the initial events occurring in *ggt1* leaves that trigger the long-term acclimation responses, plants transferred from high CO<sub>2</sub> to air were analyzed.

#### **A short-term transfer of *ggt1* plants from high CO<sub>2</sub> to air leads to $A_n$ inhibition without altering RuBisCO properties**

Before transfer from high CO<sub>2</sub> to air, *ggt1* mutants showed no growth phenotype compared to WT plants (Figure 2). RuBisCO levels, activities and activation state were also similar to the WT (Table 3 and Figure S3a,b), suggesting that reduction of the RuBisCO oxygenase activity in high CO<sub>2</sub> was sufficient to inhibit the changes observed in air-grown mutants. Although metabolite levels were also similar, surprisingly, Ser content was found to be decreased by 85% in both *ggt1* lines compared to the WT before transfer (Figure 7). Recently, the phosphorylated Ser biosynthesis pathway has been shown to be important for Ser content under low photorespiratory conditions since a 3-PGA dehydrogenase mutant (*pgdh1*) produced 50% less Ser under these conditions, and showed a growth phenotype (Benstein *et al.*, 2013). It is therefore surprising

that high CO<sub>2</sub> grown *ggt1* plants mutants still exhibit a severe reduction of Ser content (Figure 7) but do not show a similar *pgdh1* growth phenotype, thus suggesting that the observed phenotype in the *pgdh1* mutants might not be due to low Ser levels. Furthermore, it appears that the low Ser content of our *ggt1* mutants is not due to the photorespiratory role of GGT but to an undetermined modification of Ser homeostasis that is independent of the photorespiratory cycle. After transfer to air, A<sub>n</sub> was seen to rapidly decrease to 63% of the WT value, NPQ increased to attain a high steady-state level while photosynthetic ETR mirrored the decrease in A<sub>n</sub> (Figure 6). The decrease in A<sub>n</sub> was not accompanied by either changes in RuBisCO properties or stomatal conductance (Table 3 and Figure S3). Earlier identified *A. thaliana* photorespiratory mutants were seen also to show a similar decrease in A<sub>n</sub> in the light, but at high photorespiratory conditions (50% O<sub>2</sub>) (Somerville and Ogren, 1980, 1981, 1982; Chastain and Ogren, 1989). Several of these photorespiratory mutants were characterized also at 21% O<sub>2</sub> and they showed a decrease in A<sub>n</sub> with an increase in NPQ after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air. Furthermore, the excess absorbed light resulted in an inhibition of photosystem 2 (PS2) D1 protein synthesis leading to photoinhibition (Takahashi *et al.*, 2007). NPQ is associated with high energy state thermal dissipation induced by a pH gradient across the thylakoid membrane, changes in light harvesting antenna distribution between the two photosystems called state 1–state 2 transitions, and PS2 damage leading to photoinhibition. The latter two processes are associated with dark relaxation times of 10 min to several hours, whereas the pH gradient is rapidly reversed within 1–2 min (see Hodges *et al.*, 1989 and Horton *et al.*, 1996), therefore the rapid dark-induced changes in F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>' indicate that no photoinhibition was occurring under our conditions (Figure 6). High NPQ values are associated with low CO<sub>2</sub> assimilation rates and Calvin cycle activities since the non-dissipation of the pH gradient slows photosynthetic ETR and thus decreases NADPH and ATP production, reducing light activation of Calvin cycle enzymes by thioredoxins (Dai *et al.*, 2004), and RuBP recycling. Therefore, the high NPQ state of *ggt1* leaves in the light clearly indicates a notable disequilibrium between light absorption, photosynthetic ETR, CO<sub>2</sub> assimilation, and RuBP recycling. Since RuBisCO levels, extractable activities and activation state did not differ between the short-term transferred *ggt1* and WT plants (Table 3 and Figure S3), we propose that our data fit better with a defect in RuBP recycling due to the reduction in photorespiratory C-recycling observed in *ggt1* leaves as highlighted by the increase in glyoxylate levels (Figure 7). Since changes in ETR mirror those of A<sub>n</sub> in transferred *ggt1* plants, the NADPH/NADP<sup>+</sup> ratio might be expected not to change significantly while the continuous high pH gradient would reduce ATP synthesis and lower the ATP/ADP ratio

(Table 3). Finally, TCA cycle organic acid contents (Table S2), and dark respiration rate (Table 2) were not different between WT and *ggt1* plants after the short-term transfer, suggesting that altered C-allocation to the TCA cycle is not a short-term response to C-limitation and therefore the differences in ATP/ADP ratio after transfer do not appear to be linked to mitochondrial respiration.

Interestingly, after a longer-term acclimation after transfer from high CO<sub>2</sub> to air the *ggt1* leaves began to exhibit a reduced growth rate when compared to WT plants (Figure 8). This was accompanied by differences in leaf RuBisCO levels between the mutant and Col-0 plants (Figures 8c and S3b). Thus, such observations are in agreement with the idea that *ggt1* growth in air becomes limited by the reduced photosynthetic capacity of the mutant leaves that eventually has a negative impact on RuBisCO amounts.

In conclusion, we have shown that the photorespiratory phenotype of air-grown *A. thaliana ggt1* mutants is initially the result of a reduction in photorespiratory C-recycling, leading to a large increase in glyoxylate that rapidly affects leaf photosynthetic properties. As a consequence, RuBisCO fixes less CO<sub>2</sub>, resulting in a C-limitation that impacts N-assimilation, thus further decreasing RuBisCO content. This negative feedback cycle continues until *ggt1* plants attain a new homeostatic state that maintains a constant C/N balance. The need to balance plant N demand with available assimilated C produces smaller, slower growing plants.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Material and growth conditions

Studies were carried out with *A. thaliana* wild-type (WT) plants ecotype Columbia (Col-0) and T-DNA mutants of *GGT1* (At1 g23310), GK-649H07 (*ggt1-1*) and GK-847E07 (*ggt1-2*) obtained from GABI-Kat (University of Bielefeld, Bielefeld, Germany). Plants were grown in air (380 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> air) or high CO<sub>2</sub> (3000 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> air), under a 8 h light/16 h dark cycle (20°C/18°C), in growth chambers (at 200 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> of light intensity) on commercial peat substrate fertilized with 1 kg m<sup>-3</sup> of a 17:10:14 nitrogen/phosphate/potassium mix. Transfer experiments were carried out on 6-week-old WT and *ggt1* plants grown in high CO<sub>2</sub> and transferred to air for the night prior to a 4 h light (200 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) treatment (short-term) or for up-to-12 days (long term at 350 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) before being frozen in liquid nitrogen and stored. For air-grown plant analyses, 15 *ggt1* rosettes were pooled for each extraction. Five-week-old plants were taken at the middle of the photoperiod and frozen in liquid nitrogen and stored.

### Isolation of T-DNA mutants and quantitative RT-PCR

PCR-based screening was used to isolate homozygous T3 T-DNA insertion lines for *ggt1-1* and *ggt1-2*. Primers P1, P2, P3, P4, P5 and P6 were used for genomic DNA screening (for primer sequences, see Table S4). Genomic DNA was extracted as in Edwards *et al.*, 1991. The primers used for amplification of the WT gene were P1-P2 for *ggt1-1* and P5-P6 for *ggt1-2*. Primers used for

T-DNA/gene junction amplification were P3-P4 for *ggt1-1* and P4-P5 for *ggt1-2*. Total RNA was obtained by TRIzol® extraction of 200 mg frozen powdered 5-week-old rosette leaves. After a DNase treatment of 1 µg extracted RNA, 500 ng of RNA were taken for reverse transcription according to the supplier's protocol (Promega, Charbonnières, France). The resulting cDNAs were diluted three-fold for quantitative PCR analysis using SYBR green and a Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The primers for *GGT1* and *GGT2* amplification were P7-P8 and P9-P10, respectively. *GGT* transcript levels were normalized to *ACTIN 2* (P11 and P12 primers).

### Rosette leaf enzymatic activities

For GGT activities, after grinding frozen material to a fine powder, leaf proteins were extracted in 100 mM Tris-HCl (pH 7.3) containing an anti-protease cocktail (Complete-Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The suspension was centrifuged 20 000 *g* for 10 min at 4°C, and 0.5 mL of each supernatant was desalted by filtration on a NAP-5 column (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK). GGT activity was measured spectrophotometrically by monitoring NADH oxidation at 340 nm in a mixture containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.3), 20 mM glutamate, 1 mM glyoxylate, 0.18 mM NADH, 83 mM NH<sub>4</sub>Cl and 0.3 U glutamate dehydrogenase and 230 µg of extracted soluble proteins. RuBisCO activity was carried out using leaf soluble proteins extracted at 4°C with degasified 100 mM Bicine, pH 8. After a short spin (10 sec) the supernatant was used for activity measurements as described in Ward and Keys (1989). For total RuBisCO activity, 25 µg of extracted soluble proteins were incubated with 10 mM NaHCO<sub>3</sub> and 20 mM MgCl<sub>2</sub> for 10 min before adding 660 µM RuBP. For initial RuBisCO activities, NaHCO<sub>3</sub> and MgCl<sub>2</sub> were added after the RuBP. Leaf soluble protein levels were calculated using the Bradford reagent (Sigma-Aldrich Chimie, St Quentin Fallavier, France) with bovine serum albumin as the standard.

### Gas-exchange measurements

After transfer, a fully expanded leaf was placed in a gas-exchange chamber (LCF 6400-40, LiCOR, Lincoln, NE, USA) connected to a portable photosynthesis system (LI 6400XT, LiCOR, Lincoln, Nebraska, USA). Standard measuring conditions were: 200 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> of light intensity, a leaf temperature of 21°C, 60–70% relative humidity (VPD leaf approximately equal to 1), 380 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> and 0.21 L O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Measurements were also carried out at 1900 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> to examine high CO<sub>2</sub> grown WT and mutant plants before transfer to air. Chlorophyll fluorescence parameters were measured using the leaf fluorescence chamber and calculated as follows (see Maxwell and Johnson, 2000):  $F_v = F_m - F_o$ ,  $F_v' = F_m' - F_o'$ ,  $NPQ = (F_m - F_m') / F_m'$ ,  $ETR = ((F_m' - F_v) / F_m') 0.5 \times \alpha_{leaf}$  with  $\alpha$  corresponding to the irradiance in µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup> and  $\alpha_{leaf}$  to the light absorption coefficient of a leaf (= 0.85; see Peterson and Havir, 2001). Plants were adapted 30 min to darkness before measuring the  $F_o$  and  $F_m$  levels. After illumination, measurements were taken during 3 h and for a further 1 h after being placed in the dark. For  $A_n/c_i$  curves and  $A_n/ PAR_{in}$  curves, plants were light acclimated for 1 h at 380 µL L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> to allow *ggt1* mutants to attain a stationary  $A_n$  level. The CO<sub>2</sub> concentrations used were 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, and 1200 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> and for Col-0, 50 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> was added. CO<sub>2</sub> compensation points were calculated by regression analyses of the linear range of the curve (100 to 400 µL L<sup>-1</sup>).  $PAR_{in}$  values used for all genotypes were 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, and 1750 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>. The PIB was measured after a 30 min adaption of plants at 100 µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> and

1000 µmol photons m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>, before turning off the light for 10 min (Laisk and Sumberg, 1994; Kebeish *et al.*, 2007). The transient CO<sub>2</sub> peak was recorded every 2 sec.

### Metabolite analyses by GC-MS and HPLC

Rosette leaves were lyophilized for 96 h, and ground to a fine powder. Metabolites were extracted with cold methanol. Amino acids were quantified by HPLC and relative metabolite levels were analyzed by GC-MS according to Noctor *et al.*, 2007.

### Chlorophyll contents

Chlorophylls were acetone-extracted from finely ground leaf material and chlorophyll contents were calculated from absorbance values at 663 nm and 646 nm according to Porra *et al.*, 1989.

### Nitrate and ammonia contents

Fifty milligrams of finely ground frozen material was re-solubilized with 1 mL extraction buffer containing 100 mM HCl and 0.2% polyvinylpyrrolidone. After centrifugation, 10 min at 10 000 *g* and 4°C, the resulting supernatant was used for each assay. Nitrate amounts were calculated from the absorbance values at 410 nm, following the formation of nitrosalicylate ion according to Cataldo *et al.* (1975). For ammonia quantification, 10 µL of supernatant was mixed with 0.5 mL of 0.33 M sodium phenolate (pH 13), 0.5 mL of 1.5% NaClO and 0.5 mL of H<sub>2</sub>O and incubated for 1 h at room temperature. The ammonia-derived indophenol was quantified spectrophotometrically at 635 nm.

### Soluble glucose and starch contents

One hundred milligrams of frozen material was re-solubilized in 1 mL of 1 M HClO<sub>4</sub> at 4°C. After a 5 min centrifugation at 10 000 *g* and 4°C, the supernatant was transferred to a new tube and the pellet was kept for starch detection. Supernatants were adjusted to pH 7 using a buffer containing Tris 0.5 M pH 7.5 and 5 mM K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and centrifuged for 5 min at 10 000 *g* and 4°C. The resulting supernatant was used to measure soluble glucose. The pellets were dried 2 h at 50°C, resuspended in 1 mL of deionised water and incubated for 2 h at 100°C. After adjusting the pH to 7 by adding approximately 500 µL of 200 mM acetate-sodium buffer, pH 4.8, starch was digested to glucose overnight at 60°C by the addition of 0.5 U amyloglucosidase. Glucose contents were measured using the R-Biopharm kit (Boehringer Mannheim, Darmstadt, Germany) by following the manufacturer's instructions.

### Pyridine nucleotide, ATP and ADP contents

Reduced and oxidized pyridine nucleotides were measured from soluble leaf extracts as previously described (Queval and Noctor, 2007). For ATP and ADP measurements, 100 mg of rosette leaves from WT and *ggt1* plants were extracted with 0.5 mL of 2.3% trichloroacetic acid. After a 30 min centrifugation at 16 000 *g* and 4°C, the supernatant was adjusted to pH 7 with 1 mL of 100 mM Tris-acetate buffer pH 7.75. ATP was directly quantified by luminescence using a luciferase ATP detection assay kit (ABCAM, Paris, France). ADP was converted to ATP for 10 min at room temperature using 1 U pyruvate kinase, 1 mM PEP, 12.5 mM KCl<sub>2</sub> and 25 mM MgCl<sub>2</sub>. The additional ATP detected corresponded to the ADP in the extract.

### Total carbon and nitrogen contents

Two milligrams of lyophilized frozen material were burned in an elemental analyser (Pyrocube, Elementar, Lyon, France) and the



resulting N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> gas quantified by isotopic mass spectrometry against standards (ammonium sulfate (N1IAEA and N2IAEA) 21.2% N, acetanilide 10.36% N and 71.09% C, glutamic acid (AGIAEA USGS40) 9.51% N and 40.82% C).

### RuBisCO amounts by SDS-PAGE

Leaves were harvested at the middle of the photoperiod and their leaf area measured (using ImageJ software) before being frozen and ground to a fine powder. Soluble proteins were extracted in 100 mM Bicine, pH 8 supplemented with an anti-protease cocktail (Complete-Mini, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to give a leaf surface per volume ratio of either 10 cm<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup> (long-term acclimation experiments) or 5 cm<sup>2</sup> mL<sup>-1</sup> (air-grown plants). Proteins were separated on SDS-PAGE gels (10% acrylamide) and proteins were detected by Coomassie blue staining as in Laemmli (1970). The amount of RuBisCO large subunit per leaf area was quantified from stained gels using ImageJ software.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work is supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the 'Investissement d'Avenir' programme, through the 'Lidex-3P' project and a French State grant (ANR-10-LABX-0040-SPS) funded by the IDEX Paris-Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02. YD was supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education and Research. We would like to thank Françoise Gilard and Caroline Mauve of the Institute of Plant Sciences Paris-Saclay Métabolisme-Métabolome facility for their help with the GC-MS and HPLC analyses and Céline Masclaux-Daubresse (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA, Versailles) for her help with the whole-plant chlorophyll fluorescence measurements.

### SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Figure S1.** Leaf weights and soluble protein levels of WT and *ggt1* plants grown in either air or high CO<sub>2</sub>.

**Figure S2.** Response of A<sub>n</sub> to CO<sub>2</sub> and light in WT and *ggt1* leaves after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

**Figure S3.** Relative RuBisCO amounts per leaf surface of WT and *ggt1* leaves before and after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air and the development of a slight photorespiratory growth phenotype.

**Figure S4.** Non-photochemical fluorescence quenching of air-grown WT and *ggt1* rosettes.

**Table S1.** Relative metabolite levels of air-grown WT and *ggt1* leaves.

**Table S2.** Gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters of high CO<sub>2</sub> grown WT (Col-0) and *ggt1* rosettes measured in CO<sub>2</sub>-enriched air.

**Table S3.** Relative metabolite levels of WT and *ggt1* leaves before after a short-term transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

**Table S4.** Primers used in this work.

### REFERENCES

Anderson, L.E. (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 237–244.

Bauwe, H. and Kolukisaoğlu, U. (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *J. Exp. Bot.* **54**, 1523–1535.

Bauwe, H., Hagemann, M. and Fernie, A.R. (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci.* **15**, 300–336.

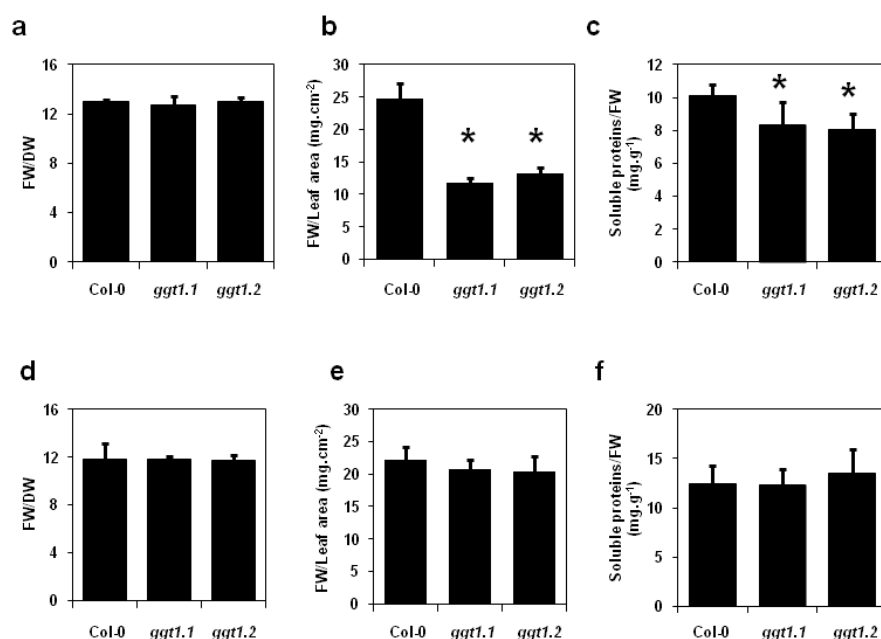
Benstein, R.M., Ludwig, K., Wulfert, S., Wittek, S., Gigolashvili, T., Frerigmann, H., Gierth, M., Flüge, U.-I. and Krueger, S. (2013) Arabidopsis phosphoglycerate dehydrogenase 1 of the phosphoserine pathway is

essential for development and required for ammonium assimilation and tryptophan biosynthesis. *Plant Cell*, **25**, 5011–5029.

- Bloom, A.J., Burger, M., Rubio Asensio, J.S. and Cousins, A.B. (2010) Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in wheat and Arabidopsis. *Science*, **328**, 899–903.
- Campbell, W.J. and Ogren, W.L. (1990) Glyoxylate inhibition of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed and reconstituted chloroplasts. *Photosynth. Res.* **23**, 257–268.
- Cataldo, D.A., Maroon, M., Schrader, L.E. and Youngs, V.L. (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **6**, 71–80.
- Chastain, C.J. and Ogren, W.L. (1989) Glyoxylate inhibition of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activation state *in vivo*. *Plant Cell Physiol.* **30**, 937–944.
- Cook, C.M., Mulligan, R.M. and Tolbert, N.E. (1985) Inhibition and stimulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by glyoxylate. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 392–401.
- Dai, S., Johansson, K., Miginiac-Maslow, M., Schürmann, P. and Eklund, H. (2004) Structural basis of redox signaling in photosynthesis: structure and function of ferredoxin:thioredoxin reductase and target enzymes. *Photosynth. Res.* **79**, 233–248.
- Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acid. Res.* **19**, 1349.
- Engel, N., van den Daele, K., Kolukisaoğlu, U., Morgenthal, K., Weckwerth, W., Pärnik, T., Keeberg, O. and Bauwe, H. (2007) Deletion of glycine decarboxylase in Arabidopsis is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiol.* **144**, 1328–1335.
- Florian, A., Araujo, W.L. and Fernie, A.R. (2013) New insights into photorespiration obtained from metabolomics. *Plant Biol.* **15**, 656–666.
- Foyer, C.H., Bloom, A.J., Queval, G. and Noctor, G. (2009) Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetic, and redox signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**, 455–484.
- Hodges, M., Cornic, G. and Briantais, J.-M. (1989) Chlorophyll fluorescence from spinach leaves: resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta*, **974**, 289–293.
- Horton, P., Ruban, A.V. and Walters, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 655–684.
- Igarashi, D., Miwa, T., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinzaki, K. and Ohsumi, C. (2003) Identification of photorespiratory glutamate: glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. *Plant J.* **33**, 975–987.
- Igarashi, D., Tsuchida, H., Miyao, M. and Ohsumi, C. (2006) Glutamate:glyoxylate aminotransferase modulates amino acid content during photorespiration. *Plant Physiol.* **142**, 901–910.
- Izumi, M., Tsunoda, H., Suzuki, Y., Makino, A. and Ishida, H. (2012) RBCS1A and RBCS3B, two major members within the Arabidopsis RBCS multigene family, function to yield sufficient RuBisCO content for leaf photosynthetic capacity. *J. Exp. Bot.* **63**, 2159–2170.
- Joshi, V., Laubengayer, K.M., Schauer, N., Fernie, A.R. and Jander, G. (2006) Two Arabidopsis threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool. *Plant Cell*, **18**, 3564–3575.
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsh, H.-J., Rosenkranz, R., Stähler, N., Schönfeld, B., Kreuzaler, F. and Peterhänsel, C. (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech.* **25**, 593–599.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Laisk, A. and Sumberg, A. (1994) Partitioning of the leaf CO<sub>2</sub> exchange into components using CO<sub>2</sub> exchange and fluorescence measurements. *Plant Physiol.* **106**, 689–695.
- Liepmann, A.H. and Olsen, L.J. (2003) Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **131**, 215–227.
- Lu, Y., Li, Y., Yang, Q., Zhang, Z., Chen, Y., Zhang, S. and Peng, X.-X. (2013) Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating RuBisCO in rice. *Physiol. Plant.* **150**, 463–476.

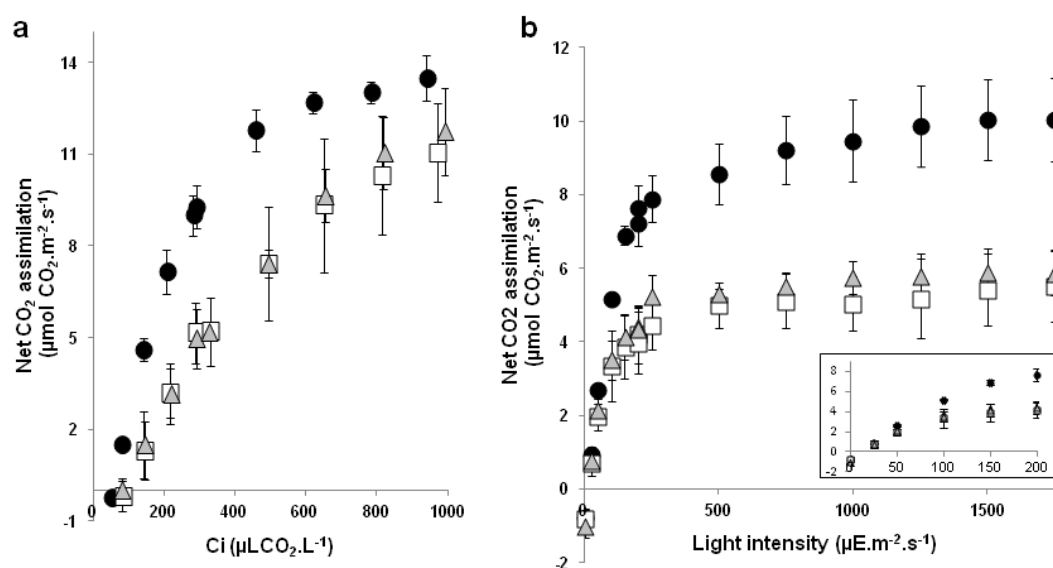
- Maier, A., Fahnenstich, H., von Caemmerer, S., Engqvist, M.K.M., Weber, A.P.M., Flügge, U.-I. and Maurino, V.G. (2012) Transgenic introduction of a glycolate oxidative cycle into *A. thaliana* chloroplasts leads to growth improvement. *Front. Plant Sci.* **3**, 1–12.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**, 659–668.
- Mulligan, R.M., Wilson, B. and Tolbert, N.E. (1983) Effects of glyoxylate on photosynthesis by intact chloroplasts. *Plant Physiol.* **72**, 415–419.
- Noctor, G., Bergot, G., Mauve, C., Thominet, D., Lelarge-Trouverie, C. and Prioul, J.-L. (2007) A comparative study of amino acid measurements in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics*, **3**, 161–174.
- Nölke, G., Houdelet, M., Kreuzaler, F., Peterhänsel, C. and Schillberg, S. (2014) The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotech. J.* **6**, 734–742.
- Peterson, R.B. and Havir, E.A. (2001) Photosynthetic properties of an *Arabidopsis thaliana* mutant possessing a defective PsbS gene. *Planta*, **214**, 142–152.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. and Kriedmann, P.E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384–394.
- Queval, G. and Noctor, G. (2007) A plate reader method for the measurement of NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal. Biochem.* **363**, 58–69.
- Quick, W.P., Schurr, U., Fichtner, K., Schulze, E.-D., Rodermeier, S.R., Bogorad, L. and Stitt, M. (1991) The impact of decreased RuBisCO on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense *rbcS*. *Plant J.* **1**, 51–58.
- Rachmilevitch, S., Cousins, A.B. and Bloom, A.J. (2004) Nitrate assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 11506–11510.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Wang, K., Ryu, C.M., Kaudal, A. and Mysore, K.S. (2012) Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24**, 336–352.
- Ros, R., Muñoz-Bertomeu, J. and Krueger, S. (2014) Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci.*, **19**, 564–569.
- Rott, M., Martins, N.F., Thiele, W., Lein, W., Bock, R., Kramer, D.M. and Schöttler, M.A. (2011) ATP synthase repression in tobacco restricts photosynthetic electron transport, CO<sub>2</sub> assimilation, and plant growth by over acidification of the thylakoid lumen. *Plant Cell*, **23**, 304–321.
- Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 2684–2687.
- Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol.*, **67**, 666–671.
- Somerville, C.R. and Ogren, W.L. (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem. J.*, **202**, 373–380.
- Sudo, E., Suzuki, Y. and Makino, A. (2014) Whole-plant growth and N utilization in transgenic rice plants with increased or decreased RuBisCO content under different CO<sub>2</sub> partial pressures. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1905–1911.
- Takahashi, S., Bauwe, H. and Badger, M. (2007) Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **144**, 487–494.
- Tcherkez, G., Bligny, R., Gout, E., Mahé, A., Hodges, M. and Cornic, G. (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> conditions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 797–802.
- Timm, S. and Bauwe, H. (2013) The variety of photorespiratory phenotypes—employing the current status for future research directions on photorespiration. *Plant Biol.*, **15**, 737–747.
- Timm, S., Mielewszick, M., Florian, A., Frankenbach, S., Dreissen, A., Hocken, N., Fernie, A.S., Walter, A. and Bauwe, H. (2012) High-to-low CO<sub>2</sub> acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, **7**, e42809.
- Ward, D.A. and Keys, A.J. (1989) A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynth. Res.*, **22**, 167–171.
- Xu, H., Zhang, J., Zeng, J., Jiang, L., Liu, E., Peng, C., He, Z. and Peng, X. (2009) Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. *J. Exp. Bot.*, **60**, 1799–1809.

## SUPPORTING INFORMATION



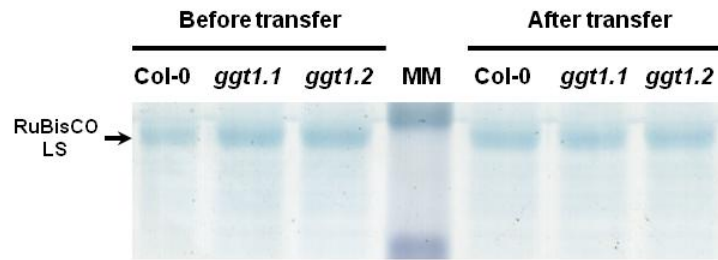
**Figure S1.** Leaf weights and soluble protein levels of WT and *ggt1* plants grown in either air or high CO<sub>2</sub>.

Weight ratios and soluble protein levels determined on rosette leaves from WT, *ggt1.1* and *ggt1.2* plants after either 5-weeks growth in air (a-c), or 6-weeks growth in high CO<sub>2</sub> (3000  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) (d-f). Errors bars represent the SD for 6 plants. Values that are significantly different from the WT are denoted (\*, t-test  $P < 0.05$ )



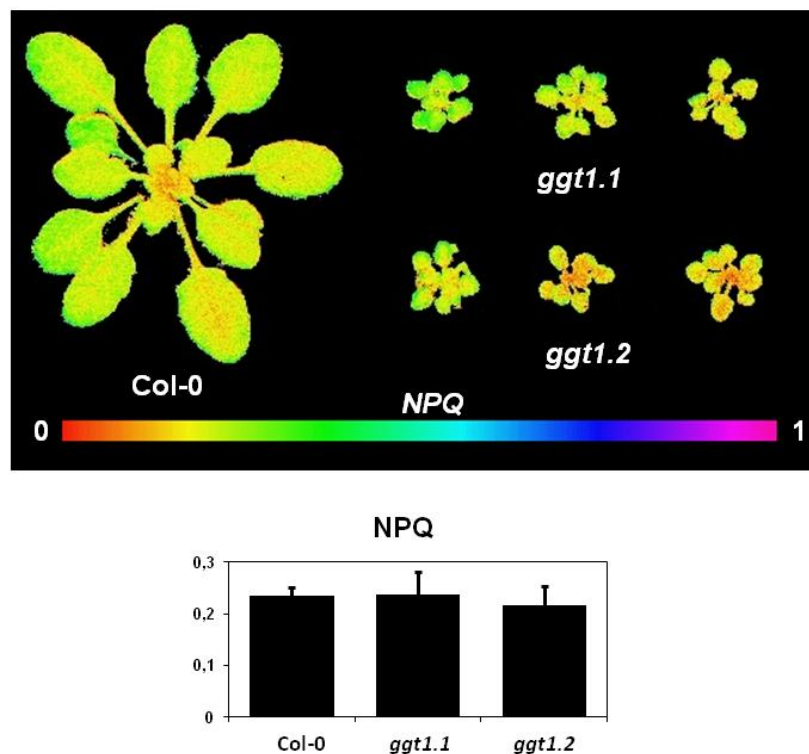
**Figure S2.** Response of A<sub>n</sub> to CO<sub>2</sub> and light in WT and *ggt1* leaves after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

(a) CO<sub>2</sub> response curves performed at a light intensity of 200  $\mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . C<sub>i</sub> is an approximation of the CO<sub>2</sub> concentration within the chloroplast (expressed in  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ). (b) Light response curves performed at 380  $\mu\text{L CO}_2.\text{L}^{-1}$ . Plants were grown during 6 weeks in high CO<sub>2</sub> (3000  $\mu\text{L CO}_2.\text{L}^{-1}$ ) before being transferred to air. Col-0 (circles), *ggt1.1* (squares) and *ggt1.2* (triangles). Errors bars represent the SD for 3 independent plants.



**Figure S3.** Relative RuBisCO amounts per leaf surface of WT and *ggt1* leaves before and after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air and the development of a slight photorespiratory growth phenotype.

SDS-PAGE coomassie blue-stained RuBisCO large subunit from total soluble protein extracts of identical WT and *ggt1* rosette leaf areas of high CO<sub>2</sub> grown plants (HC) and after transfer to air at the beginning of the night period and 4 h of light treatment the following day (a) or after 3, 6, 9 and 12 days in air (b). The appearance of a slight photorespiratory growth phenotype of the *ggt1* mutants after transfer from to high CO<sub>2</sub> to air is shown in (c).



**Figure S4.** Non-photochemical fluorescence quenching of air-grown WT and *ggt1* rosettes.

False-color imaging of calculated NPQ ( $(F_m - F_m')/F_m'$ ) of WT and *ggt1* rosettes using a PAM-Imager. Plants were 30 min dark-adapted before measuring the  $F_v/F_m$  and subsequently illuminated for 1 h before measuring the  $F_m'$ . The histograms show the mean NPQ values with standard error bars corresponding to either 24 or 42 measurements made on either 3 or 7 independent WT and *ggt1* plants, respectively.



**Table S1.** Relative metabolite levels of air-grown WT and *ggt1* leaves.

	Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>		Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>
<u>Amino acids</u>				<u>Organic acids</u>			
Alanine	1.00 ± 0.12	<b>1.40</b> ± 0.13	<b>1.31</b> ± 0.06	2-oxoglutarate	1.00 ± 0.83	0.48 ± 0.28	0.35 ± 0.29
Aspartate	1.00 ± 0.58	1.17 ± 0.41	1.02 ± 0.44	Ascorbate	1.00 ± 0.08	1.13 ± 0.07	0.99 ± 0.12
Cysteine	1.00 ± 0.31	<b>1.93</b> ± 0.37	<b>1.57</b> ± 0.12	Citramalate	1.00 ± 0.11	<b>0.78</b> ± 0.14	0.79 ± 0.19
GABA	1.00 ± 0.17	1.13 ± 0.07	1.01 ± 0.01	Citrate	1.00 ± 0.55	1.10 ± 0.57	0.85 ± 0.45
Glutamine	1.00 ± 0.51	1.71 ± 0.57	<b>1.81</b> ± 0.36	Fumarate	1.00 ± 0.06	<b>0.48</b> ± 0.05	<b>0.41</b> ± 0.09
Glutamate	1.00 ± 0.60	1.56 ± 0.45	1.35 ± 0.54	Glycerate	1.00 ± 0.01	<b>0.55</b> ± 0.05	<b>0.60</b> ± 0.06
Glycine	1.00 ± 0.13	<b>1.32</b> ± 0.12	<b>1.25</b> ± 0.11	Glyoxylate	1.00 ± 0.21	<b>5.61</b> ± 0.74	<b>4.16</b> ± 0.38
Homoserine	1.00 ± 0.10	0.92 ± 0.11	0.86 ± 0.07	Malate	1.00 ± 0.59	0.95 ± 0.49	0.72 ± 0.41
Isoleucine	1.00 ± 0.04	1.09 ± 0.07	0.98 ± 0.04	Maleate	1.00 ± 0.18	1.22 ± 0.31	1.15 ± 0.37
Leucine	1.00 ± 0.07	<b>1.85</b> ± 0.08	<b>1.63</b> ± 0.11	Pyruvate	1.00 ± 0.07	<b>0.68</b> ± 0.10	<b>0.73</b> ± 0.16
Methionine	1.00 ± 0.23	<b>1.48</b> ± 0.21	1.18 ± 0.21	Succinate	1.00 ± 0.07	<b>0.71</b> ± 0.07	<b>0.62</b> ± 0.08
Phenylalanine	1.00 ± 0.40	1.36 ± 0.26	1.14 ± 0.22	<u>Miscellaneous</u>			
Proline	1.00 ± 0.09	<b>2.17</b> ± 0.56	<b>1.53</b> ± 0.10	Glycerol	1.00 ± 0.14	<b>2.12</b> ± 0.18	<b>1.81</b> ± 0.18
Serine	1.00 ± 0.11	<b>0.25</b> ± 0.02	<b>0.22</b> ± 0.02	Glycerol-3-Phosphate	1.00 ± 0.31	1.82 ± 0.80	1.57 ± 0.68
Threonine	1.00 ± 0.05	<b>0.73</b> ± 0.06	<b>0.70</b> ± 0.04	<i>Myo</i> -inositol	1.00 ± 0.03	<b>0.42</b> ± 0.05	<b>0.39</b> ± 0.03
<u>Carbohydrates</u>				Nicotinate	1.00 ± 0.42	<b>2.06</b> ± 0.24	<b>2.06</b> ± 0.22
Fructose	1.00 ± 0.02	<b>1.16</b> ± 0.05	1.05 ± 0.12	Phosphorate	1.00 ± 0.11	<b>1.82</b> ± 0.30	<b>1.67</b> ± 0.27
Galactose	1.00 ± 0.53	<b>2.44</b> ± 0.66	<b>2.09</b> ± 0.70	Putrescine	1.00 ± 0.07	<b>1.70</b> ± 0.14	<b>1.50</b> ± 0.16
Glucopyranose	1.00 ± 0.04	<b>1.14</b> ± 0.08	0.96 ± 0.15	Shikimate	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.07	<b>0.91</b> ± 0.04
Glucose	1.00 ± 0.04	<b>1.14</b> ± 0.08	0.96 ± 0.15	Stearate	1.00 ± 0.18	<b>0.68</b> ± 0.06	<b>0.59</b> ± 0.03
Ribose	1.00 ± 0.12	<b>2.18</b> ± 0.09	<b>1.89</b> ± 0.23	Tyramine	1.00 ± 0.13	<b>5.79</b> ± 0.49	<b>4.85</b> ± 0.27
Sucrose	1.00 ± 0.07	<b>1.11</b> ± 0.03	1.01 ± 0.04	Urea	1.00 ± 0.22	<b>1.66</b> ± 0.26	<b>1.34</b> ± 0.15
Xylose	1.00 ± 0.02	<b>0.90</b> ± 0.07	<b>0.87</b> ± 0.05				

GC-TOF-MS metabolite analyses of air-grown WT and *ggt1* leaf extracts sampled at the middle of the photoperiod. Relative metabolite contents are shown with the corresponding WT contents arbitrarily set to 1. Errors bars represent the SD for 3 pools of 5-week old plants (n=3). Values that are significantly different from the WT are in bold (t-test, P<0.05).

**Table S2.** Gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters of high CO<sub>2</sub> grown WT (Col-0) and *ggt1* rosettes measured in CO<sub>2</sub>-enriched air.

	Col-0	<i>ggt1-1</i>	<i>ggt1-2</i>
A <sub>n</sub> (μmol CO <sub>2</sub> . m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	10.3 ±0.4	11.0 ±1.2	10.6 ±0.4
R <sub>dark</sub> (μmol CO <sub>2</sub> . m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	-1.13 ±0.16	-1.31 ±0.22	-1.19 ±0.14
Stomatal conductance (mmol H <sub>2</sub> O.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	0.06 ±0.01	0.06 ±0.00	0.07 ±0.01
Day transpiration (mmol H <sub>2</sub> O.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	0.72 ±0.13	0.64 ±0.03	0.79 ±0.15
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0.81 ±0.01	0.82 ±0.01	0.82 ±0.01
ETR (Arbitrary units)	40.0 ±3.7	41.8 ±5.1	41.3 ±2.1
NPQ (Arbitrary units)	0.42 ±0.03	0.53 ±0.12	<b>0.58 ±0.08</b>

Measurements were made in air containing 1900 μL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Values are the means ±SD of data from three 6-week-old plants for each line. Significantly different values from the Col-0 data are in bold (Student's t-test, P<0.05). A<sub>n</sub>= net CO<sub>2</sub> assimilation rate; R<sub>dark</sub>=dark respiration; F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>= variable chlorophyll fluorescence/maximal chlorophyll fluorescence; ETR= photosynthetic electron transfer rate; NPQ=non-photochemical fluorescence quenching.

**Table S4.** Primers used in this work. All sequences are given in the orientation 5' to 3'.

Primer name	Sequence (5' -> 3')
P1	CCTTGCCCTTGGCTCTAGAACC
P2	GTCATACCTAAACCGCCTGAAGTC
P3	TAACTCTCCCCACTCTTTGCC
P4	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
P5	CTTCCAGGAGTTAGGAAAGAGGTT
P6	AAGACAGACCCTTGGAGGGAG
P7	TTCTTCTTCTGAACGACTATTGTG
P8	GAATAGGGCAAAGAGAAAGAGTG
P9	TCACTTCTTCTTCTTTCACGACA
P10	GAGTTTGACACAGAGTAGGACCA
P11	GGTAACATTGTGAGTGGTGG
P12	AACGACCTTAATCTTCATGCT

**Table S3.** Relative metabolite levels of WT and *ggt1* leaves before and after a short-term transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

	Before transfer						After transfer to air and 4h light					
	Col-0 Mean	SD	<i>ggt1-1</i> Mean	SD	<i>ggt1-2</i> Mean	SD	Col-0 Mean	SD	<i>ggt1-1</i> Mean	SD	<i>ggt1-2</i> Mean	SD
Alpha-Alanine	1	0.29	0.99	0.18	0.90	0.13	0.45	0.20	<b>0.34</b>	<b>0.07</b>	<b>0.38</b>	<b>0.03</b>
Aspartic acid	1	0.42	0.95	0.12	<b>0.59</b>	<b>0.15</b>	0.78	0.37	0.57	0.08	0.43	0.08
Beta-alanine	1	0.25	1.17	0.64	0.78	0.19	<b>0.50</b>	<b>0.12</b>	0.60	0.07	0.62	0.11
Cysteine	1	0.14	0.84	0.10	0.94	0.10	1.11	0.30	0.96	0.24	1.15	0.20
GABA	1	0.14	1.10	0.31	0.98	0.13	0.92	0.09	0.75	0.13	0.91	0.41
Glutamate	1	0.36	0.89	0.07	0.55	0.17	1.05	0.44	0.92	0.54	0.58	0.24
Glutamine	1	0.34	0.88	0.18	0.55	0.09	1.17	0.61	1.59	0.67	1.57	0.29
Glycine	1	0.06	0.96	0.16	0.75	0.22	<b>7.29</b>	<b>3.57</b>	1.82	0.51	<b>1.94</b>	<b>0.30</b>
Homoserine	1	0.08	1.04	0.21	<b>0.65</b>	<b>0.08</b>	1.07	0.49	<b>0.55</b>	<b>0.04</b>	<b>0.52</b>	<b>0.05</b>
Isoleucine	1	0.22	0.97	0.28	0.76	0.11	1.04	0.22	0.98	0.07	0.91	0.04
Leucine	1	0.28	1.01	0.37	0.80	0.17	1.06	0.21	1.37	0.11	1.29	0.05
Lysine	1	0.17	1.10	0.16	0.86	0.20	0.93	0.15	0.92	0.09	0.87	0.22
Methionine	1	0.31	1.04	0.11	0.98	0.24	1.24	0.31	0.78	0.25	0.89	0.15
Phenylalanine	1	0.19	0.90	0.23	0.63	0.22	1.24	0.48	0.76	0.05	0.77	0.13
Proline	1	0.35	0.64	0.28	0.61	0.33	1.34	0.39	0.72	0.24	<b>0.52<sup>a</sup></b>	<b>0.10<sup>a</sup></b>
Serine	1	0.15	<b>0.15</b>	<b>0.06</b>	<b>0.13</b>	<b>0.03</b>	1.33	0.21	<b>0.09<sup>a</sup></b>	<b>0.00<sup>a</sup></b>	<b>0.09<sup>a</sup></b>	<b>0.01<sup>a</sup></b>
Threonine	1	0.16	0.82	0.24	0.66	0.14	1.12	0.41	<b>0.59</b>	<b>0.08</b>	<b>0.67</b>	<b>0.06</b>
Valine	1	0.19	0.98	0.26	0.85	0.14	0.88	0.24	1.01	0.22	1.11	0.07
Citric acid	1	0.38	1.05	0.13	0.81	0.10	1.43	0.89	1.32	0.33	0.92	0.18
Fumaric acid	1	0.27	1.19	0.21	1.24	0.61	3.00	1.58	2.04	1.26	1.63	0.61
Glyceric acid	1	0.12	<b>1.45</b>	<b>0.04</b>	1.28	0.29	<b>3.13</b>	<b>0.52</b>	<b>2.86</b>	<b>0.32</b>	<b>2.61</b>	<b>0.38</b>
Glyoxylic acid	1	0.09	1.14	0.17	0.94	0.17	1.16	0.35	<b>9.19<sup>a</sup></b>	<b>2.85<sup>a</sup></b>	<b>10.47<sup>a</sup></b>	<b>2.29<sup>a</sup></b>
Lactic acid	1	0.10	1.28	0.41	0.89	0.19	0.93	0.10	0.93	0.09	0.87	0.19
Malic acid	1	0.30	0.92	0.18	0.68	0.18	1.36	0.73	1.12	0.28	0.90	0.17
Oxalic acid	1	0.70	0.63	0.05	0.60	0.05	0.59	0.05	0.58	0.02	0.58	0.04
Pyruvic acid	1	0.04	1.07	0.08	1.05	0.11	0.98	0.16	1.07	0.31	<b>1.22</b>	<b>0.08</b>
Succinic acid	1	0.30	1.07	0.35	0.82	0.18	1.97	0.84	1.22	0.50	0.80	0.06
Fructose	1	0.26	0.88	0.81	1.01	0.58	0.66	0.38	0.35	0.32	<b>0.21</b>	<b>0.06</b>
Galactose	1	0.21	1.23	0.29	<b>2.07</b>	<b>0.49</b>	<b>1.40</b>	<b>0.11</b>	1.35	1.23	0.97	0.33
Galactosylglycerol	1	0.15	1.05	0.25	1.25	0.21	1.22	0.17	1.31	0.18	<b>1.41</b>	<b>0.14</b>

Glucopyranose	1	0.22	0.96	0.72	0.75	0.12	1.77	1.44	0.62	0.22	0.84	0.52
Glucose	1	0.14	1.24	1.24	1.29	0.53	1.11	0.66	0.55	0.56	<b>0.33</b>	<b>0.14</b>
Lactose	1	0.11	1.05	0.06	1.01	0.19	1.18	0.18	0.98	0.09	1.13	0.15
Maltose	1	0.01	1.19	0.13	1.03	0.21	1.12	0.10	1.19	0.17	1.22	0.23
Raffinose	1	0.48	0.87	0.11	1.59	0.63	0.91	0.30	1.10	0.99	0.66	0.19
Rhamnose	1	0.02	1.15	0.17	1.13	0.11	0.96	0.20	0.97	0.14	<b>1.10</b>	<b>0.04</b>
Ribose	1	0.08	1.15	0.19	1.06	0.15	1.03	0.12	1.47	0.33	<b>1.57</b>	<b>0.13</b>
Sucrose	1	0.06	0.95	0.32	0.88	0.13	0.91	0.17	0.99	0.19	1.00	0.13
Xylose	1	0.18	1.15	0.21	1.22	0.12	1.21	0.45	0.89	0.08	1.02	0.25
Allantoin	1	0.19	1.21	0.28	<b>2.04</b>	<b>0.50</b>	1.35	0.12	1.33	1.19	0.96	0.31
Ascorbic acid	1	0.33	1.31	0.59	1.35	0.21	1.79	1.03	1.05	0.14	1.50	0.61
Benzoic acid	1	0.37	0.78	0.09	0.75	0.11	0.80	0.07	0.86	0.03	0.76	0.07
Cyclohexylamine	1	0.06	1.08	0.03	0.98	0.10	1.04	0.11	1.07	0.10	0.96	0.14
Digalactosylglycerol	1	0.21	1.06	0.07	1.12	0.16	0.86	0.10	0.88	0.33	0.86	0.05
Erythrono-1,4-lactone	1	0.17	1.12	0.20	0.98	0.25	<b>1.97</b>	<b>0.49</b>	1.26	0.25	1.50	0.41
Ethanolamine	1	0.15	1.08	0.36	0.96	0.23	0.96	0.16	0.80	0.06	0.91	0.19
Galactinol	1	0.04	1.03	0.12	1.33	0.44	<b>1.37</b>	<b>0.07</b>	1.29	0.55	1.12	0.19
Galactonic acid	1	0.16	1.01	0.12	0.80	0.03	1.17	0.25	0.93	0.09	1.06	0.15
Glycerol	1	0.13	1.09	0.08	0.88	0.08	0.98	0.06	0.97	0.10	1.09 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>
Levogluconan	1	0.33	1.19	0.06	1.24	0.27	0.80	0.05	0.88	0.36	0.97	0.11
Palmitic acid	1	0.11	1.06	0.11	0.96	0.16	1.06	0.12	1.06	0.11	0.97	0.04
Phosphoric acid	1	0.08	0.77	0.14	<b>0.56</b>	<b>0.07</b>	<b>0.62</b>	<b>0.04</b>	1.16 <sup>a</sup>	0.29 <sup>a</sup>	<b>0.62</b>	<b>0.07</b>
Pipecolic acid	1	0.47	1.12	1.06	0.78	0.03	0.44	0.12	0.49	0.07	0.68	0.33
Putrescine	1	0.34	1.23	0.55	1.27	0.18	0.97	0.46	0.91	0.10	1.05	0.18
Shikimic acid	1	0.26	1.00	0.01	0.80	0.12	1.36	0.38	0.59 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.59 <sup>a</sup>	0.05 <sup>a</sup>
Sinapinic acid	1	0.25	1.08	0.08	0.77	0.17	1.15	0.22	1.20	0.20	1.15	0.23
Spermidine	1	0.11	1.06	0.10	1.03	0.06	0.89	0.34	1.00	0.62	1.18	0.11
Threonic acid	1	0.30	1.20	0.38	1.14	0.26	<b>2.38</b>	<b>0.78</b>	1.45	0.52	1.70	0.64
Urea	1	0.12	1.01	0.09	1.03	0.18	1.18	0.02	1.19	0.23	1.06	0.15

GC-TOF-MS metabolite analyses of high CO<sub>2</sub>-grown WT and *ggt1* leaf extracts sampled at the middle of the photoperiod, before and after transfer to air (during a night and after 4h of light the following day). Relative metabolite contents are shown with the corresponding high CO<sub>2</sub> WT contents arbitrarily set to 1. Errors bars represent the SD for 3 pools of plants. Values that are significantly different from the Col-0 before transfer are in bold and values that are significantly different from the Col-0 after transfer are labeled “a” (t-test, P<0.05).

### **Article III.**

**Un mutant photorespiratoire glycolate oxydase chez *Arabidopsis thaliana* montre une altération de son allocation de carbone et de la sénescence dans ses feuilles après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air**

## **An Arabidopsis photorespiratory glycolate oxidase mutant exhibits altered carbon allocation and leaf senescence after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air**

Younès Dello, Mathieu Jossier, Nathalie Glab, Céline Oury, Guillaume Tcherkez<sup>1</sup>, Michael Hodges\*

Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, CNRS, Univ. Paris-Sud, INRA, Univ. d'Evry, Univ. Paris-Diderot, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

\*Corresponding author: Michael Hodges, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay, CNRS, Université Paris-Sud, INRA, Université d'Evry, Université Paris-Diderot, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France, Tel. +33 169153335, e-mail: [michael.hodges@u-psud.fr](mailto:michael.hodges@u-psud.fr)

### **Running title**

Inhibited photorespiration triggers leaf senescence

### **Footnotes**

This work is supported by a public grant overseen by the French National Research Agency (ANR) as part of the « Investissement d'Avenir » program, through the "Lidex-3P" project and a French State grant (ANR-10-LABX-0040-SPS) funded by the IDEX Paris-Saclay, ANR-11-IDEX-0003-02. YD was supported by a PhD grant from the French Ministry of Higher Education and Research.

<sup>1</sup>Present address: Research School of Biology, College of Medicine, Biology and Environment, Australian National University, Canberra, 2601, ACT, Australia.

\*Corresponding author: Michael Hodges, [michael.hodges@u-psud.fr](mailto:michael.hodges@u-psud.fr)

## ABSTRACT

Metabolic and physiological analyses of *Arabidopsis thaliana* glycolate oxidase (GOX) mutant leaves were performed to understand the development of the photorespiratory phenotype after transfer from high CO<sub>2</sub> to air. We show that two *Arabidopsis* genes, *GOX1* and *GOX2*, share a redundant photorespiratory role. Air-grown single *gox1* and *gox2* mutants developed normally and no significant differences in leaf metabolic levels and photosynthetic activities were found when compared to wild-type plants. To study the impact of a highly reduced GOX activity on plant metabolism, both *GOX1* and *GOX2* expression was knocked-down using an artificial microRNA strategy. Air-grown *amiRgox1/2* plants with a residual 5% GOX activity exhibited a severe growth phenotype. When high-CO<sub>2</sub>-grown adult plants were transferred to air, the photosynthetic activity of *amiRgox1/2* was rapidly reduced to 50% of the control level and a high non-photochemical fluorescence quenching was maintained. <sup>13</sup>C-labeling revealed that daily assimilated carbon accumulated in glycolate, leading to reduced carbon-allocation to sugars, organic acids and amino acids. Such changes were not always mirrored in leaf total metabolite levels, since many soluble amino acid levels increased after transfer while protein, RuBisCO and chlorophyll amounts decreased in *amiRgox1/2* plants. The senescence marker, SAG12, was induced only in the *amiRgox1/2* rosettes after air-transfer. The expression of maize photorespiratory GOX in *amiRgox1/2* abolished the observed phenotypes. The results indicate that the inhibition of the photorespiratory cycle inhibits photosynthesis and alters carbon allocation thus leading to a C-limitation that triggers senescence in old rosette leaves.

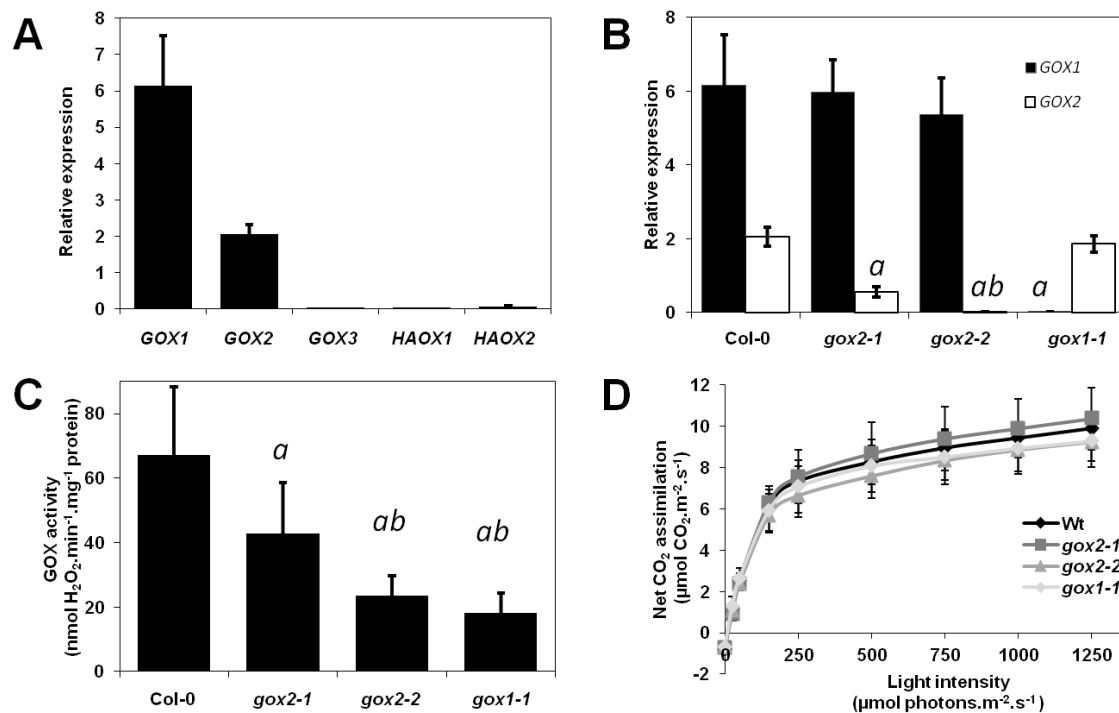


## INTRODUCTION

Photorespiration is a major metabolic pathway of plant primary metabolism resulting from the oxygenase activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) that produces 2-phosphoglycolate (2-PG), a toxic compound (Anderson, 1971). It acts as a recycling pathway to metabolize 2-PG into 3-phosphoglycerate (3-PGA), that can be reused by the Calvin cycle. This carbon (C)-recycling is achieved by enzymes and transporters mainly located in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. The photorespiratory cycle requires two molecules of 2-PG to produce one molecule of 3-PGA, with the loss of a CO<sub>2</sub>, an NH<sub>3</sub> and the consumption of one molecule of ATP and NADH (see Bauwe *et al.*, 2010). It is strongly linked to leaf primary metabolism including photosynthesis, nitrogen assimilation, amino acid metabolism, the TCA cycle, and C<sub>1</sub>-metabolism as they use common enzymes, metabolites and cofactors (Takahashi *et al.*, 2007; Tcherkez *et al.*, 2008; Hanson and Gregory, 2011; Ros *et al.*, 2013; Bloom, 2015). Thus, photorespiration appears to be important for maintaining a stable leaf metabolic activity. Therefore, it is not surprising that mutants for key photorespiratory enzymes and transporters often display phenotypes associated with delayed growth, leaf chlorosis, and sometimes lethality when grown in air. Such photorespiratory phenotypes are not seen when plants are grown in high CO<sub>2</sub> conditions (see Engel *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2011; Pick *et al.*, 2013; Timm and Bauwe, 2013). Since the first identification of *Arabidopsis thaliana* photorespiratory mutants by Somerville and co-workers in the late 70's (Somerville and Ogren, 1979), mutants with a photorespiratory phenotype in air have been identified for each key photorespiratory enzyme (see Timm and Bauwe, 2013) except for glycolate oxidase (EC 1.1.3.15; GOX). This peroxisomal enzyme converts glycolate into glyoxylate with the production of hydrogen peroxide. It evolved from a bacterial lactate oxidase (Esser *et al.*, 2014), and shares a similar hydride transfer reaction mechanism with other  $\alpha$ -hydroxy acid oxidase family members (Dellero *et al.*, 2015b). *Arabidopsis thaliana* contains five putative GOX-encoding genes: *GOX1* (At3g14420), *GOX2* (At3g14415), *GOX3* (At4g18360), *HAOX1* (At3g14130), and *HAOX2* (At3g14150). A proteomic analysis showed GOX1 and GOX2 to be the major GOX isoforms in *A. thaliana* leaf peroxisomes (Reumann *et al.*, 2007). Recently, single GOX knock-out mutants for each *Arabidopsis* GOX gene have been characterized but they did not show a photorespiratory phenotype in air even though they exhibited only 25% of the control leaf GOX activity. However, GOX was shown to be an essential component of non-host resistance in *Arabidopsis*, since the mutants were more sensitive after inoculation with avirulent strains of *P. syringae* (Rojas *et al.*, 2012). Recently, GOX3 has been shown to support L-lactate

oxidation in *Arabidopsis* roots (Engqvist *et al.*, 2015). Tobacco RNAi lines targeting *GOX* with between 10 and 20% of normal leaf *GOX* activity showed a delay growth phenotype and leaf chlorosis. They had a 70% decrease of photosynthetic electron transfer rate (ETR) and a 30% increase of non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) at a light intensity  $>200 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (Yamaguchi and Nishimura, 2000). Similar results have been observed in rice with inducible antisense lines targeting either *OsGLO1* or *OsGLO4* having 40% and 20% of normal *GOX* activity, respectively. They exhibited delayed growth in air, low net  $\text{CO}_2$  assimilation rates, reduced initial RuBisCO activities and lower RuBisCO activation states (Xu *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2013). In *Z. mays*, the identification of a *GOX* mutant (*go1*) with a strong photorespiratory phenotype in air, and low rates of  $\text{CO}_2$  fixation after a transfer from high  $\text{CO}_2$  to air, confirmed that *GOX* activity was also essential for this  $\text{C}_4$ -plant, where photorespiration rates are less important compared to  $\text{C}_3$ -plants (Zelitch *et al.*, 2009). Therefore, a low leaf *GOX* activity results in a strong inhibition of photosynthesis and growth when plants are grown in air or transferred from high  $\text{CO}_2$  to air.

In this work we have analyzed single *GOX* knock-out mutants and an artificial microRNA *GOX* line (*amiRgox1/2*) to identify the photorespiratory *GOX* genes in *A. thaliana*. The *amiRgox1/2* line was used to investigate the impact of a low leaf *GOX* activity on photorespiratory processes and the subsequent consequences on leaf photosynthesis, C-allocation and metabolites levels. After a transfer from high  $\text{CO}_2$  to air, *amiRgox1/2* rosettes showed a rapid inhibition of photosynthesis coupled to an increase of NPQ, due to a reduced photorespiratory activity.  $^{13}\text{C}$ -labeling experiments revealed that daily assimilated carbon was accumulated in glycolate, and that this led to a reduced C-allocation to sugars, organic acids and amino acids. These metabolic changes eventually led old leaves to develop severe senescence symptoms. We propose that a strong inhibition of the photorespiratory cycle inhibits photosynthesis and alters carbon allocation thus leading to C-limited leaves that trigger senescence in old rosette leaves.



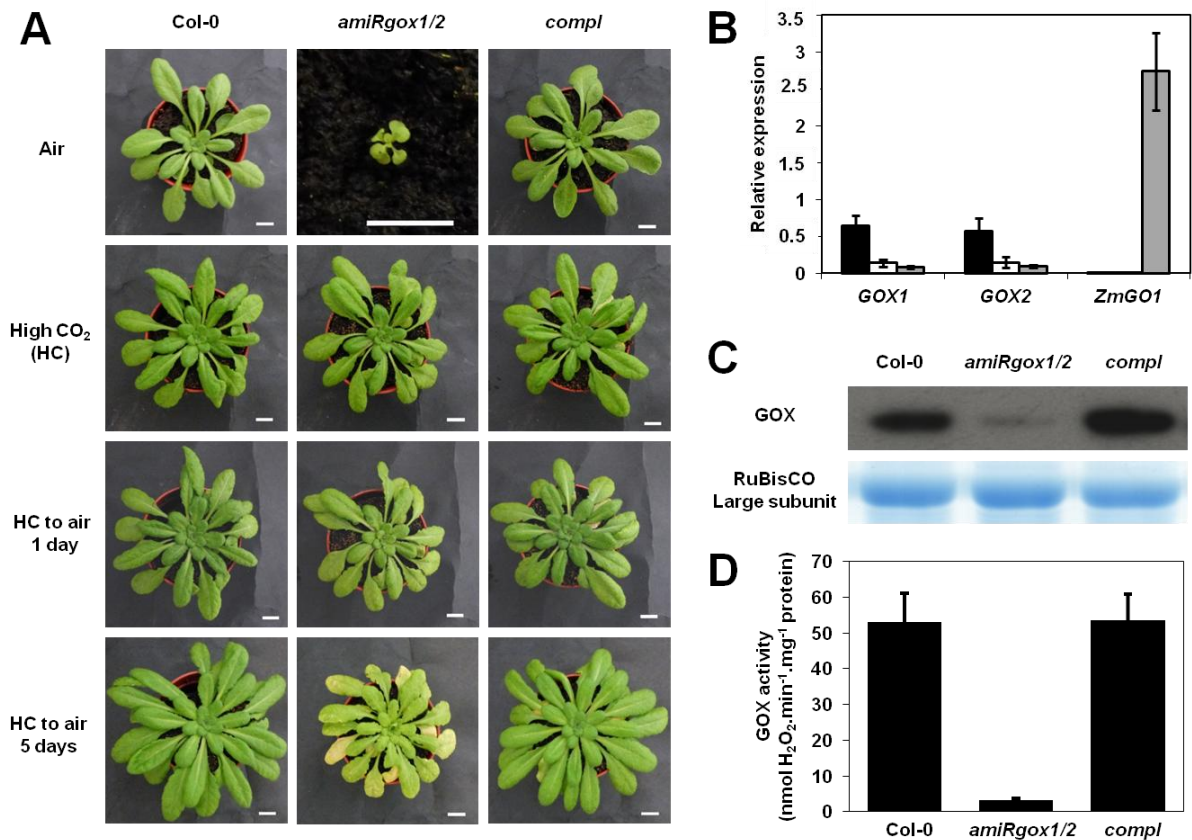
**Figure 1.** Identification and characterization of single *GOX1* and *GOX2* knock-out mutants. Expression analyses by qPCR (relative to *ACTIN2*) of A, *Arabidopsis thaliana* GOX and HAOX transcripts using total RNA from leaves of 5-week-old Col-0 plants (n = 4) and B, *GOX1* and *GOX2* transcripts using total RNA from leaves of 5-week-old Col-0, *gox2-1*, *gox2-2* and *gox1-1* plants (n = 9). C, Leaf GOX activity from 5-week-old *gox2-1*, *gox2-2* and *gox1-1* mutants (n = 9). (D) Light response curves of net CO<sub>2</sub> assimilation of 7-week-old *gox2-1*, *gox2-2* and *gox1-1* leaves (n = 6 independent plants). Values are means ±SD.

<sup>a</sup> represents data that are significantly different from the Col-0 value and <sup>b</sup> from the *gox2-1* value with a Student's test (P<0.05).

## RESULTS

### ***GOX1* and *GOX2* are the photorespiratory GOX genes of *Arabidopsis thaliana***

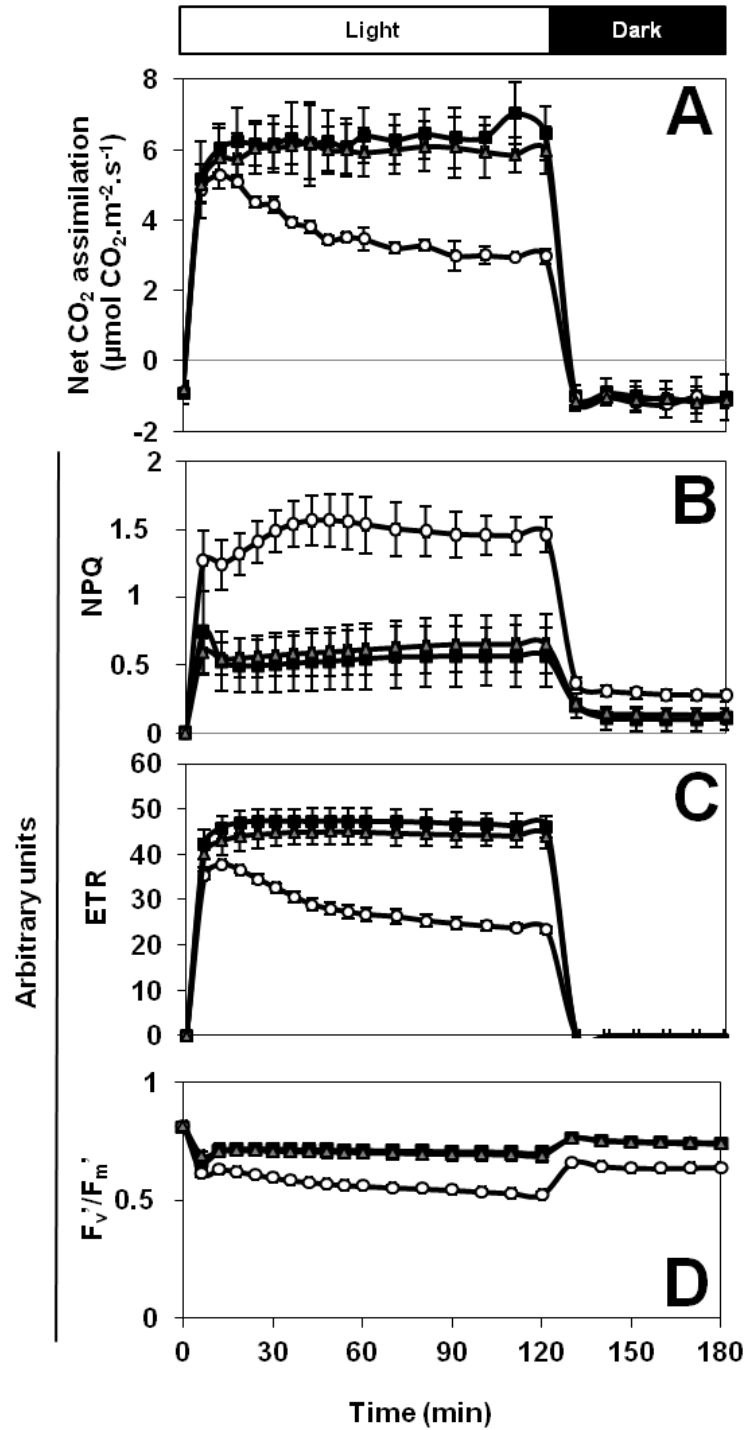
In order to down-regulate photorespiratory GOX activity to examine the interplay between the photorespiratory cycle and leaf primary metabolism, it was first necessary to identify the photorespiratory GOX gene(s) in *Arabidopsis thaliana*. Public microarray expression data suggested that *GOX1* and *GOX2* were the major GOX genes expressed in leaves of *Arabidopsis* (Genevestigator, <https://genevestigator.com>), although the probes used did not discriminate between them. This was confirmed by quantitative RT-PCR (qPCR) analyses of the five *Arabidopsis* GOX genes using total RNA extracted from Col-0 rosette leaves and gene-specific primers. Indeed, *GOX1* and *GOX2* transcripts were at least 100-fold more abundant than the transcripts of the other three genes (*GOX3*, *HAOX1* and *HAOX2*), with *GOX1* transcript levels being 3-fold higher than those of *GOX2* (Fig. 1A). Three homozygous T-DNA insertion mutant lines were isolated to examine the function of *GOX1* and *GOX2* in leaf metabolism: *gox1-1* with the T-DNA inserted in the 9th exon of *GOX1*, *gox2-1* with the T-DNA inserted 10 pb before the start of the 5' UTR region of *GOX2* and *gox2-2* with the T-DNA inserted in the 5' UTR region of *GOX2* (see Supplemental Fig. S1). Transcript abundance analyses by qPCR revealed *gox2-2* and *gox1* to be knock-out mutants (with 200-fold less *GOX2* RNA in *gox2-2* and 1000-fold less *GOX1* RNA in *gox1-1* when compared to WT levels) while *gox2-1* was only a knock-down mutant, since it contained 25% of leaf *GOX2* transcript levels compared to the control (Fig. 1B). No evidence of compensation by either *GOX1* or *GOX2* was observed in the *gox2* and *gox1* plants, respectively. Each mutant line exhibited a reduced leaf GOX activity (27% of WT GOX activity for *gox1-1*, 35% for *gox2-2* and 64% for *gox2-1*) (Fig. 1C), that correlated with the measured transcript levels (Fig. 1B). Rosette leaf growth and development of each mutant were similar to control plants after growing in air on soil for 5 weeks (Supplemental Fig. S1). The absence of a growth phenotype has already been reported for single *gox* mutants grown *in vitro* on MS medium agar plates (Rojas *et al.*, 2012) and in soil (Engqvist *et al.*, 2015). Relative metabolite analyses of rosette leaves from our *gox* mutants using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) confirmed that photorespiration did not appear to be affected, since there was no accumulation of glycolate and other photorespiratory-related metabolite levels remained unchanged when compared to Col-0 levels. However, there was a trend of reduced TCA-cycle organic acids including citrate, malate and succinate (Supplemental Table S2). Since



**Figure 2.** Identification and growth phenotype of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* lines. A, Growth phenotype of 6-week-old Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants grown under short days on soil in air or high CO<sub>2</sub> (HC; 3000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ) conditions and then transferred to air for either 1 or 5 days (White bar = 1 cm). B, qPCR analyses of *GOX1*, *GOX2* and *ZmGO1* expression relative to *ACTIN2* in each HC-grown plant line. C, Western blot analysis of GOX protein levels of HC-grown Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosette leaves, with an SDS-PAGE gel showing Coomassie blue-stained RuBisCO large subunit as a protein loading control. D, GOX activity of 6-week-old HC-grown Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosette leaves (n = 3 independent plants).

photorespiratory mutants exhibit an impaired photosynthetic activity in air (Somerville and Ogren, 1980, 1981 and 1982; Chastain and Ogren, 1989; Timm *et al.*, 2012) and since photorespiration becomes more important at higher light intensities, light response curves of net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ) were carried out on fully expanded leaves from 6-week-old Col-0 and mutant plants however, no significant differences were observed between the different plants (Fig. 1D). It was concluded that 27% of WT leaf extractable GOX activity was sufficient for *A. thaliana* to maintain unchanged photorespiratory and photosynthetic activities in air, even at saturating light intensities.

With the aim of strongly reducing the GOX activity of Arabidopsis rosette leaves, it was decided to down-regulate both *GOX1* and *GOX2* by an artificial microRNA strategy. This approach was chosen because the *GOX1* and *GOX2* genes are located in tandem on chromosome 3 (with only 517 pb between the 3'UTR region of *GOX2* and the 5'UTR region of *GOX1*), thus making obtaining double mutants impossible. A single homozygous line named *amiRgox1/2*, exhibiting a severely reduced growth phenotype in air, was obtained (Fig. 2A, Supplemental Fig. S2). This growth phenotype was not observed in high CO<sub>2</sub> conditions (HC; 3000  $\mu\text{L.L}^{-1}$  CO<sub>2</sub> in air), as expected for a photorespiratory mutant (Fig. 2A). qPCR analyses of *GOX1* and *GOX2* transcript levels from rosette leaves of Col-0 and *amiRgox1/2* grown in HC confirmed that expression of both *GOX1* and *GOX2* genes was effectively decreased in the mutant (Fig. 2B) resulting in a reduced quantity of GOX protein (Fig. 2C) and only a low 5% residual leaf GOX activity (Fig. 2D). This line was complemented with the photorespiratory GOX gene of *Z. mays* (*ZmGO1*), since the open reading frame (ORF) DNA sequence was different enough not to be targeted by the Arabidopsis amiRNA, and because *ZmGO1* exhibits similar *in vitro* enzymatic properties to Arabidopsis GOX1 and GOX2 (Dellero *et al.*, 2015b). A homozygous line expressing the *ZmGO1* ORF under the control of the photorespiratory *SHMT1* promoter in the *amiRgox1/2* mutant background (named *compl*) was selected for analysis. It was able to grow normally in air, thus complementing the photorespiratory growth phenotype of our *amiRgox1/2* line (Fig. 2A). qRT-PCR analyses showed that rosette leaves of HC grown *compl* plants contained *ZmGO1* RNA (Fig. 2B), and exhibited GOX protein amounts (Fig. 2C) and *in vitro* GOX activity at wild type levels (Fig. 2D). Taken together, our data show that the photorespiratory growth phenotype of air-grown *amiRgox1/2* plants is due to their low leaf GOX activity and that *GOX1* and *GOX2* have a redundant photorespiratory function in *A. thaliana*.



**Figure 3. Photosynthetic and chlorophyll fluorescence parameters of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosettes after transfer from HC to air.**

A, Net CO<sub>2</sub> assimilation, B, non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQ), C, photosynthetic electron transfer rate (ETR) and D, F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>' ratio values of 7-week-old HC-grown Col-0 (black squares), *amiRgox1/2* (white circles) and *compl* (grey triangles) transferred to air at the beginning of the experiment. After 2 h, the light was switched off and measurements were recorded for a further hour. Values are means ±SD of 3 independent plants.



## Carbon assimilation and allocation are altered upon the transfer of *amiRgox1/2* plants from HC to air

Since photorespiration interacts with leaf primary metabolism, it was decided to carry out physiological and metabolic analyses (gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements,  $^{13}\text{CO}_2$ -labelling experiments, and relative metabolite content analyses by GC-MS) using Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants before and after their transfer from HC to air, so as to better understand the impact of a blocked/reduced photorespiratory cycle pathway on plant metabolism.

First, the photosynthetic and dark respiratory properties of fully expanded rosette leaves after the direct transfer of plants from HC to air were investigated using a LiCOR gas exchange system coupled to a chlorophyll fluorescence analyzer. As already reported for some photorespiratory mutants, *amiRgox1/2* leaves showed a light-dependent decrease in net  $\text{CO}_2$  assimilation rate ( $A_n$ ) in air, attaining a stationary  $A_n$  level that was 44% of WT and *compl* plant values after 60 min of illumination (Fig. 3A, Table 1). A similar observation was made for the calculated photosynthetic electron transfer rate (ETR) (Fig. 3C). Interestingly, all plant lines showed a rapid increase in their non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) as soon as light was applied, however this parameter continuously increased in *amiRgox1/2* plants to reach a stable level of 1.5 arbitrary units after 60 min while the NPQ of Col-0 and *compl* leaves remained lower at 0.5-0.6 units (Fig. 3B). After 2 h of light treatment, plants were acclimated to the dark, and a rapid dark-reversion of  $F_v'/F_m'$  values was seen in all lines (Fig. 3D). Stomatal  $\text{CO}_2$  conductance and dark respiration  $\text{CO}_2$  release were similar between all transferred lines (Table 1). No differences in gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters were observed when measurements were made after a direct transfer from HC to the high  $\text{CO}_2$  measurement conditions of  $1900 \mu\text{L.L}^{-1} \text{CO}_2$  in air (Supplemental Table S3). Thus the observed changes in net  $\text{CO}_2$  assimilation rate of *amiRgox1/2* rosette leaves highlight a progressive decrease of their photosynthetic and C-assimilatory capacities after transfer to air, and this was due to the low GOX content and activity of *amiRgox1/2* leaves.

To further characterize the photosynthetic inhibition in leaves of the *amiRgox1/2* line,  $\text{CO}_2$  and light response curves were performed on plants acclimated to air (after their transfer from HC conditions) in the light for an hour after  $A_n$  had become stable. The  $A_n$  of *amiRgox1/2* leaves remained lower than Col-0 and *compl* leaves, even at high  $\text{CO}_2$  ( $1900 \mu\text{L.L}^{-1}$  in air) (Supplemental Fig. S3A). The  $\text{CO}_2$  compensation point calculated from the linear part of the  $\text{CO}_2$  response curves ( $\text{Ci}$  range between 50 and  $300 \mu\text{L CO}_2.\text{L}^{-1}$  of air) was 2.3-fold higher in

**Table 1.** Gas exchange measurements of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosette leaves after transfer from HC to air.

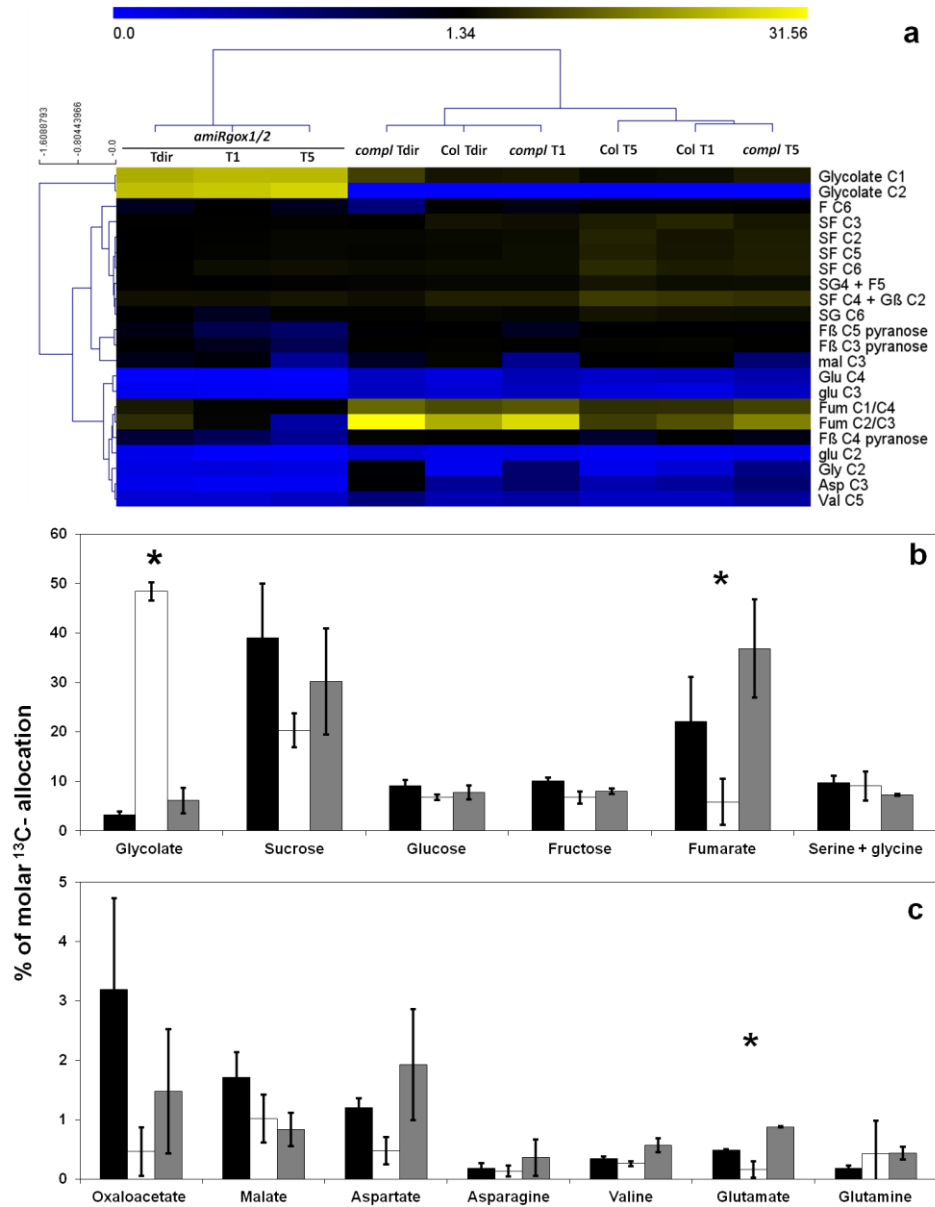
	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>
	$\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
$A_n$	6.49 $\pm$ 0.63	<b>2.89 <math>\pm</math> 0.12</b>	6.10 $\pm$ 0.60
$R_{\text{dark}}$	-0.93 $\pm$ 0.28	-0.88 $\pm$ 0.18	-0.79 $\pm$ 0.22
PIB	1.25 $\pm$ 0.10	<b>0.37 <math>\pm</math> 0.15</b>	1.26 $\pm$ 0.13
	$\mu\text{L CO}_2\cdot\text{L}^{-1}$		
CO <sub>2</sub> compensation point	66.64 $\pm$ 8.69	<b>160.23 <math>\pm</math> 23.59</b>	69.67 $\pm$ 5.16
	$\text{mmol H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$		
Stomatal conductance	0.155 $\pm$ 0.032	0.140 $\pm$ 0.016	0.162 $\pm$ 0.010

Net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ), dark respiration rate ( $R_{\text{dark}}$ ), post illumination burst (PIB), CO<sub>2</sub> compensation point, day transpiration and stomatal conductance of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* fully expanded rosette leaves grown during 7 weeks in high CO<sub>2</sub> and transferred to air. Values were measured after 1 h illumination. Values are means  $\pm$ SD (n = 3 independent plants). Values in bold are significantly different from Col-0 (Student's t-test, P<0.01).

the *amiRgox1/2* mutants compared to Col-0 and *compl* plants (Table 1). This result indicates that photosynthetic efficiency to compensate photorespiratory and respiratory carbon losses was severely compromised in this line. Light response curves showed that the inhibition of  $A_n$  was no longer observed in *amiRgox1/2* leaves at very low light intensities ( $< 50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) but it was still apparent as light intensity increased and  $\text{CO}_2$  and/or RuBP recycling became limiting. At a light intensity  $> 150 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ,  $A_n$  remained stable and 3-fold lower in the *amiRgox1/2* line compared to the  $A_n$  of Col-0 and *compl* plants (Supplemental Fig. S3B). The post illumination burst (PIB), corresponding to a continued glycine decarboxylase activity after switching off the light, was measured in all lines. This parameter is representative of the photorespiratory cycle activity (Kebeish *et al.*, 2007). Therefore, the lower PIB value of the *amiRgox1/2* leaves compared to those of both Col-0 and *compl* plants, suggested that photorespiration was effectively reduced in this mutant line due to the low leaf GOX activity.

Taken together our results indicate that the reduced photorespiratory activity of *amiRgox1/2* rosette leaves after transfer from HC to air brings about a rapid inhibition of photosynthetic electron transfer and C-assimilation in the light. Interestingly, this inhibition was absent at low light intensities, but not at high  $\text{CO}_2$  conditions ( $1900 \mu\text{L.L}^{-1}$ ), thus perhaps suggesting that RuBP regeneration becomes compromised in this line after transfer to air.

After 5 days of transfer from HC to air, *amiRgox1/2* plants developed a pronounced “photorespiratory” phenotype leading to a reduced rosette diameter, paler green younger leaves and yellowing older leaves with distinct small chlorotic spots (see Fig. 2A; Supplemental Fig. S2A). To understand the appearance of this phenotype and the occurrence of changes in leaf primary metabolism, especially since C-assimilation had decreased in the *amiRgox1/2* line compared to Col-0 and *compl* plants,  $^{13}\text{C}$  labeling experiments using 99%-enriched  $^{13}\text{CO}_2$  were undertaken in an attempt to identify modifications in C-allocation. Five hour labeling experiments were carried out on whole rosette leaves of intact plants after their direct transfer from HC to air (Tdirect) and after 1 (T1) and 5 days (T5).  $^{13}\text{C}$ -labeled positions of metabolites from either 99%-enriched  $^{13}\text{CO}_2$  or ambient (as a control for  $^{13}\text{C}$  natural abundance) air experiments were detected by  $^{13}\text{C}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -amounts were quantified as a percentage of molar  $^{13}\text{C}$ -allocation. Using a two-factor ANOVA (“genotype” and “time” (Pearson correlation with an interval of confidence  $> 0.95$ )), all time-points (Tdir, T1 and T5) of the *amiRgox1/2* line were significantly regrouped in the same “sample cluster” compared to the time-points of the Col-0 and *compl* lines (Fig. 4A). Interestingly, three major clusters of labeled metabolite positions that displayed different patterns regrouped all time-points for the

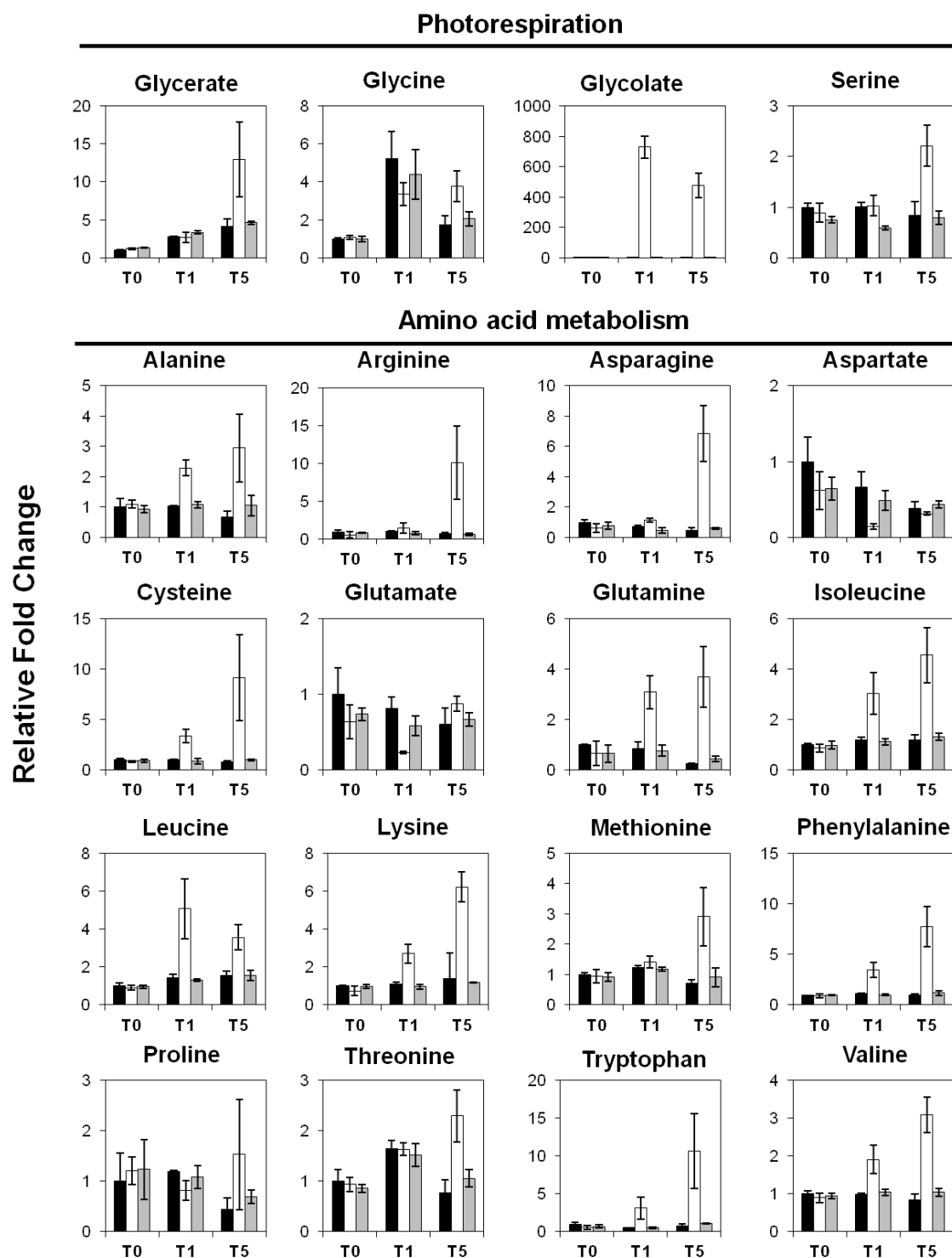


**Figure 4.**  $^{13}\text{C}$ -allocation to metabolites calculated from their  $^{13}\text{C}$ -labeled positions using  $^{13}\text{C}$ -NMR. Whole intact rosette leaves of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants were  $^{13}\text{C}$ -labeled with 99% enriched  $^{13}\text{CO}_2$  for 5 h either after a direct transfer from HC to air (Tdir) and 1 day (T1) and 5 days (T5) after transfer. Labeling experiments were carried out at  $200 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  of light intensity in an air with  $380 \mu\text{L.L}^{-1} \text{CO}_2$  and 21%  $\text{O}_2$ . Molar  $^{13}\text{C}$  allocation in C-atom positions was calculated as described in the Materials and methods.

A, Isotopomics array of significantly different % molar  $^{13}\text{C}$  allocation in C-atom positions detected by  $^{13}\text{C}$ -NMR after a two-way ANOVA using genotype and time points as factors (Pearson correlation based on F-distribution and a confidence interval  $> 0.95$ ). Major (B) and minor (C) % molar  $^{13}\text{C}$ -allocation in  $^{13}\text{C}$ -NMR-detected metabolites after a HC-to-air transfer of Col-0 (black bars), *amiRgox1/2* (white bars) and *compl* (grey bars). Values are the mean  $\pm$ SD of all time-points after transfer to air. Asterisks represent values that are significantly different from both Col-0 and *compl* lines (Student's t-test,  $P < 0.05$ ). Abbreviations: Ser, Serine; Fum, Fumarate; F, Fructose; G, Glucose; S, Sucrose; Mal, Malate; Glu, Glutamate; Gln, Glutamine; Gly, Glycine; Asp, Aspartate; Val, Valine. The complete data set is available as Supplemental Table S4.

plant lines. The first cluster contained the two C-positions of glycolate. A high % molar  $^{13}\text{C}$ -allocation in these positions (between 22 and 24% for each) was observed for the *amiRgox1/2* line and this remained relatively stable after a prolonged 5-day period after transfer to air. On the other hand, a low amount of assimilated  $^{13}\text{C}$  was identified in the glycolate of Col-0 and *compl* rosettes at each time point after transfer to air (around 5% for both C-positions) (Fig. 4 and Supplemental Table S4). This suggested that newly photosynthetically assimilated carbon was blocked in the glycolate of the *amiRgox1/2* line (Fig. 4B), in good agreement with a GOX-limiting photorespiratory cycle activity. A second major cluster contained C-positions of sucrose, fructose and malate. The % molar  $^{13}\text{C}$ -allocation in detected sugar positions appeared to be decreased at all time-points when comparing the *amiRgox1/2* plants with the Col-0 and *compl* lines (Fig. 4A). Therefore, C-allocation to sucrose and fructose was reduced, in response to the rapid decreased of C-assimilation after transfer to air in *amiRgox1/2* rosettes (Fig. 4B). The third cluster contained some C-positions of glucose, fructose, fumarate and some amino acids (Gly, Asp, Glu and Val). Again, C-allocation to fumarate (Fig. 4B) and Glu (Fig. 4C) was significantly reduced in the *amiRgox1/2* line compared to the control plants. Unexpectedly,  $^{13}\text{C}$ -allocation to serine and glycine was not significantly modified after the transfer to air of the *amiRgox1/2* line (Fig. 4C), even though photorespiratory cycle activity had been reduced. C-allocation into amino acids was low in all lines, however a general reduction in C-allocation to major amino acids was observed in *amiRgox1/2* rosettes compared to the control lines (Fig. 4C). Although a large significant decrease of C-allocation into fumarate was observed, a similar trend was detected also for oxaloacetate and malate (Fig. 4C) when comparing the *amiRgox1/2* and controls leaves. Taken together, our data suggested a global decrease in the allocation of newly assimilated carbon to major sugars, organic and amino acids in response to the decreased photosynthetic activity after transfer from HC to air of the *amiRgox1/2* line. Indeed, GOX-limited photorespiratory activity appeared to accumulate assimilated carbon into glycolate, thus decreasing C-allocation to other major metabolic pathways.

Since newly assimilated C-allocation was altered in the *amiRgox1/2* line after transfer from HC to air in the light, GC-MS analyses were carried out to investigate if this had an impact on relative metabolite levels of whole rosettes before and after transfer. A major difference was the accumulation of glycolate (730-fold and 478-fold, after 1 and 5 days, respectively) in the *amiRgox1/2* mutant while glycolate levels remained low in WT and *compl* plants after transfer to air. On the other hand, the relative levels of the downstream photorespiratory metabolites, Ser and glycerate, accumulated to higher levels in the *amiRgox1/2* leaves compared to the two



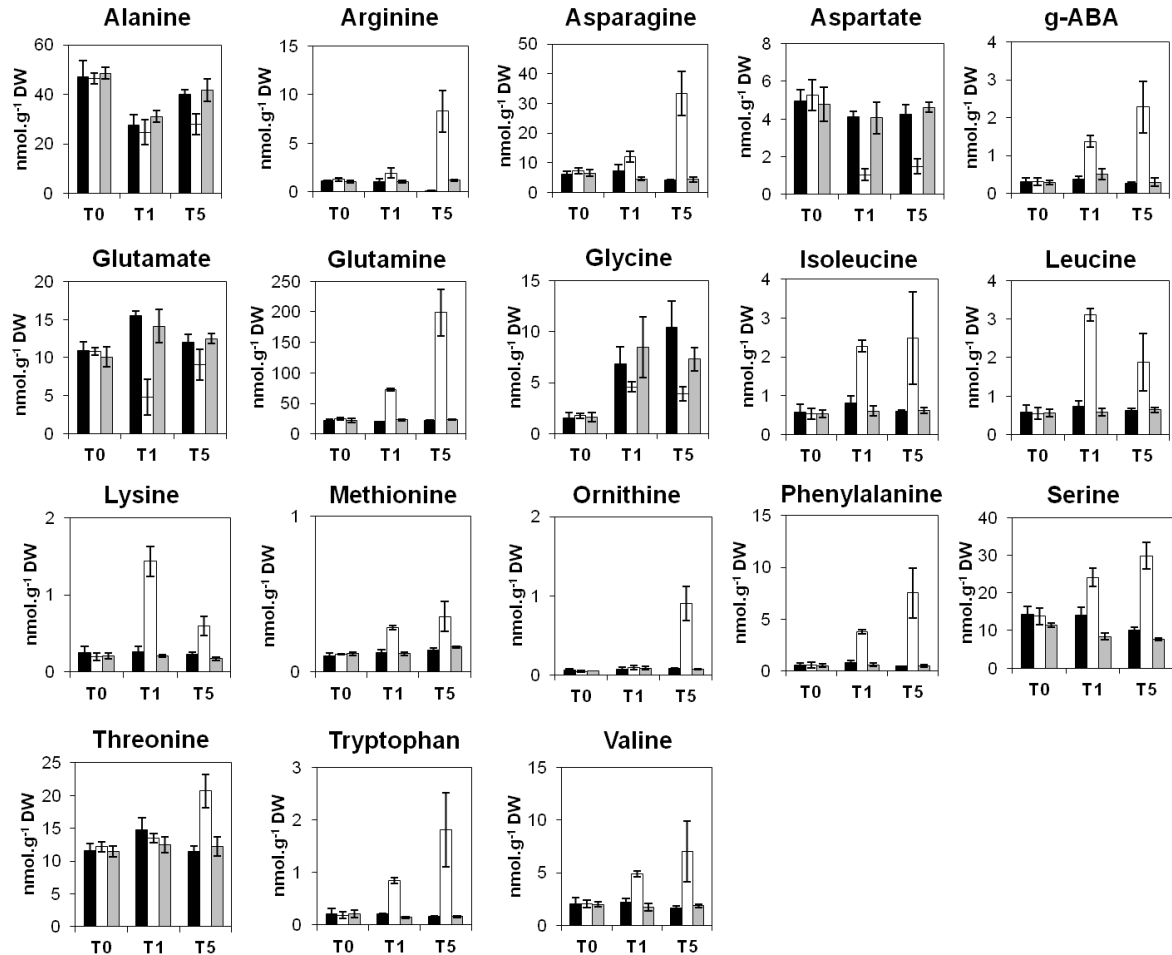
**Figure 5.** Metabolic response of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosette leaves before and after transfer from HC (T0) to air for 1 (T1) and 5 days (T5). Plants were grown in high CO<sub>2</sub> (HC; 3000  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 6 weeks at 200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  of light intensity prior to their transfer to air at midday at 350  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Relative metabolite contents (mean  $\pm$  SD, n = 3 independent plants) are given for whole rosette leaves of Col-0 (black bars), *amiRgox1/2* (white bars) and *compl* (grey bars), with the corresponding WT T0 (Col-0) content set to 1. Each histogram shows metabolites that were significantly different in the *amiRgox1/2* line compared to both the Col-0 and *compl* lines either before and/or after 1 and/or 5 days in air (Student's t-test,  $P < 0.05$ ). The complete GC-MS metabolite data set is available as Supplemental Table S5.

control lines but only after 5 days (Fig. 5). However, Gly increased in all lines tested after 1 day in air after which the Gly levels of the WT and *compl* lines decreased after 5 days, whereas Gly remained higher in the *amiRgox1/2* line (Fig. 5). The increased Gly level was not an isolated case amongst amino acids because many relative amino acids levels gradually increased after 1 and/or 5 days after transfer to air. This trend was seen for Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp and Val (Fig. 5). On the other hand, Asp and Glu relative levels decreased in the *amiRgox1/2* line after 1 day in air before returning to levels comparable to those of WT and *compl* plants after 5 days. Furthermore, there was more than a 3-fold increase in succinate, 2-hydroxyglutarate, lactate, putrescine, and urea in *amiRgox1/2* rosettes after 5 days in air compared to Col-0 and *compl* lines, with putrescine also increasing 4-fold after 1 day (Supplemental Table S5). Surprisingly, fumarate levels remained constant, even though C-allocation into fumarate was strongly decreased in the *amiRgox1/2* line after transfer (Fig. 4B and Supplemental Table S5). The relative levels of fructose and glucose decreased 2-fold in Col-0 and *compl* rosettes after 1 day of transfer to air but this was not observed in the *amiRgox1/2* line. On the other hand, raffinose showed a lower level in *amiRgox1/2* rosettes after 1 and 5 days in air compared to Col-0 after a direct transfer from HC to air (Supplemental Table S5). Although, the C-allocation data did not appear to reflect the overall relative changes in certain metabolite levels after a prolonged period after transfer from HC to air, the increased amino acid amounts suggested perhaps the onset of a catabolic metabolism program.

### **Disruption of the photorespiratory cycle in *amiRgox1/2* rosettes leads to senescence-related symptoms after transfer from HC to air**

Since the  $^{13}\text{C}$ -labelling studies indicated less assimilated C was allocated to amino acids in the *amiRgox1/2* line, it was not expected to observe increased amino acid amounts after the continued transfer to air from high  $\text{CO}_2$  (Fig. 5). However, since the old leaves of the *amiRgox1/2* rosettes became yellow (Fig. 2A; Supplemental Fig. S2), the increase in relative soluble amino acid levels might reflect the degradation of leaf proteins arising from the onset of an induced senescence. Therefore, it was decided to measure several senescence markers in the old leaves of the mutant line compared to Col-0 and *compl* plants. First, leaf soluble amino acid levels were quantified by HPLC (Fig. 6). On the whole, the observed quantitative changes in the old leaves of each line were similar to the changes in relative levels of the entire rosette obtained by GC-MS (compare Figs. 5 and 6). Indeed, in the *amiRgox1/2* line,

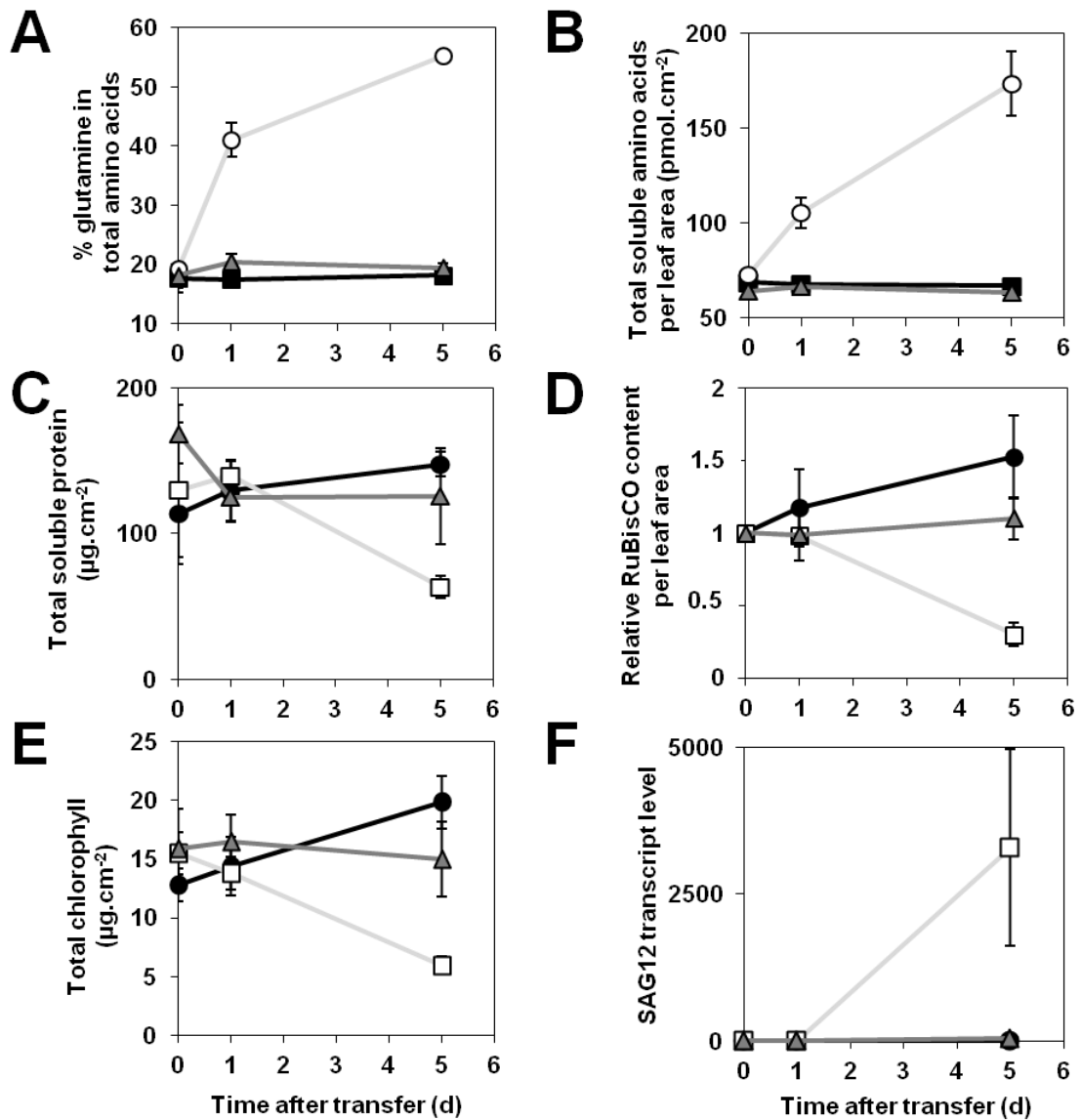




**Figure 6.** Soluble amino acid contents of old rosette leaves of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants before and after transfer from HC (T0) to air for 1 (T1) and 5 days (T5). Old rosettes leaves of Col-0 (black bars), *amiRgox1/2* (white bars) and *compl* (grey bars) were sampled at midday and soluble free amino acids were extracted and separated by HPLC. Values are means  $\pm$ SD of 3 independent pools of leaves. Histograms show amino acid contents that were significantly different in the *amiRgox1/2* line compared to both Col-0 and *compl* plants either before and/or after 1 and/or 5 days in air (Student's t-test,  $P < 0.05$ ).

Arg, Asn, Gln, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Trp, and Val amounts increased in the old leaves after 1 day and they either continued to increase or remained higher than control plant levels after 5 days while Asp and Glu levels decreased after 1 day. Ser was seen to accumulate only after 5 days of transfer to air in the *amiRgox1/2* line while Gly levels increased in each line although this increase was lower in *amiRgox1/2* (Fig. 6). After 5 days in air, the total soluble amino acid content per leaf DW did not change in the old leaves of Col-0 and *compl* plants (Fig. 6), whereas it increased 2.8-fold in the old leaves of *amiRgox1/2* plants with Gln representing more than 55% of the total soluble amino acid content (Fig. 7A). Total soluble amino acid contents per leaf area of old rosette leaves was also strongly increased in *amiRgox1/2* rosettes after transfer to air, attaining a 2.45-fold higher level than Col-0 and *compl* plant levels (Fig. 7B). Total soluble protein, relative RuBisCO contents and chlorophyll levels per leaf area were also measured in the old leaves of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants before and after HC-to-air transfer. Both soluble protein (67% less) and relative RuBisCO contents (80% less) decreased in the old leaves of *amiRgox1/2* rosettes after transfer when compared to Col-0 and *compl* lines (Fig. 7C,D). In a similar manner, total chlorophyll content per leaf area in *amiRgox1/2* started to decrease after 1 day and became 70% lower compared to Col-0 and *compl* levels after 5 days (Fig. 7E). To obtain further evidence that the yellowing of the old leaves was indeed due to senescence, the level of *SAG12* transcripts was measured by qPCR; *SAG12* is a senescence-induced cysteine protease. A large increase in *SAG12* transcripts was observed only in the old leaves of *amiRgox1/2* plants (Fig. 7F).

Taken together, the changes observed in the old leaves of *amiRgox1/2* rosettes are consistent with a photorespiration-dependent senescence-associated mutant phenotype after being transferred from HC to air for 5 days. Therefore, our data support the hypothesis that a disruption of the photorespiratory cycle due to a low GOX activity leads to plants with a reduced photosynthetic capacity and an altered C-allocation that triggers leaf senescence when plants are transferred from HC to air perhaps due to the C-limiting conditions.



**Figure 7.** Soluble amino acids, protein, RuBisCO, total chlorophyll and SAG12 transcript levels of old-rosette leaves of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* before and after transfer from HC (T0) to air for 1 (T1) and 5 days (T5). A, Glutamine/total amino acids ratio expressed in percentage of total soluble amino acid amounts. B, Total amino acid contents per cm<sup>2</sup> of leaf area obtained from the data of Figure 6. C, Soluble protein contents per cm<sup>2</sup> of leaf area. D, Relative RuBisCO content per cm<sup>2</sup> of leaf area calculated from SDS-PAGE gels stained with Coomassie blue using the ImageJ Gel tool analyzer. E, Total chlorophyll per leaf area. F, SAG12 transcript levels obtained by qPCR analysis. Each analysis was carried out using old-rosette leaves of Col-0 (black square), *amiRgox1/2* (white circle) and *compl* (grey triangle) before and after transfer from HC (T0) to air for 1 (T1) and 5 days (T5).

## DISCUSSION

### Photorespiration and C-assimilation are both affected in *amiRgox1/2* rosettes after a transfer from HC to air

To better understand the impact of low photorespiratory cycle fluxes on interacting plant primary metabolisms, it was decided to investigate mutants affected in leaf-expressed GOX genes. Amongst the five putative GOX-related genes in *A. thaliana*, only *GOX1* and *GOX2* were highly expressed in rosette leaves (Fig. 1A) and therefore they appeared to be good candidates to be involved in photorespiration. The single mutants, *gox2-1*, *gox2-2* and *gox1-1*, did not exhibit a photorespiratory phenotype when grown in air, even though their leaves contained reduced GOX activities (Fig. 1C, Supplemental Fig. S1). This was consistent with observations reported for *gox* mutants (Rojas *et al.*, 2012; Engqvist *et al.*, 2015) and the phenotypes of *gox* mutants from other plant species. Indeed, leaf GOX activity had to be decreased to 36 % of the WT activity in tobacco (Yamaguchi and Nishimura, 2000), and reduced more than 20% in rice (Xu *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2013) and 10% in maize (Zelitch *et al.*, 2009) to induce photorespiratory-limited growth symptoms. Therefore, to obtain lower GOX activities, an artificial microRNA strategy was undertaken and the resulting *amiRgox1/2* line showed low *GOX1* and *GOX2* expression, total GOX protein content and a residual 5% GOX activity (Fig. 2B-D). These low GOX activity plants showed strong dwarfism when grown in air (Fig. 2A), similar to the Class-II photorespiratory phenotypes of *shml*, *glyk1* and *agt1* (*sat1*) mutants (Somerville and Ogren, 1980; Boldt *et al.*, 2005; Engel *et al.*, 2011; Timm and Bauwe, 2013) while they grew normally in HC conditions that limits photorespiration. This growth phenotype in air was shown to be due to the low GOX activity since it was absent when *amiRgox1/2* was complemented with *ZmGO1* (Fig. 2). Due to the size of the air-grown *amiRgox1/2* rosettes, it was decided to analyze HC grown plants after their transfer to air to better understand the impact of low GOX activity on photorespiratory cycle flux and interacting primary metabolisms. Interestingly, net CO<sub>2</sub> assimilation rate ( $A_n$ ) rapidly decreased to 50% of Col-0 and *compl* plant levels after an hour of light when directly transferred from HC to air. This was accompanied by a similar decrease in photosynthetic ETR while NPQ remained higher compared to Col-0 and *compl* values (Fig. 3A-C). A rapid, decrease in photosynthetic activity is a common feature of many photorespiratory mutants (*shmt1*, *fd-gogat*, *dit2.1*, *glyk1* and recently *ggt1*) after their transfer to air, and it is accompanied by a sustained NPQ (Takahashi *et al.*, 2007; Dellero *et al.*, 2015a). A number of

hypotheses have emerged to explain this reduction of photosynthesis when *A. thaliana* plants are transferred from HC to air: accelerated photoinhibition, RuBisCO inhibition by an altered activation state and/or a decreased RuBP regeneration (see Dellore *et al.*, 2015a and references therein). First, the repair of damaged photosystem II D1 protein by *de novo* biosynthesis was found to be inhibited (or slowed down) by an unknown mechanism in *shmt1*, *fd-gogat*, *dit2.1*, *glyk1* mutants, thus leading to an accelerated photoinhibition in the light and a decrease in photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation (Takahashi *et al.*, 2007). However, changes in dark-restored chlorophyll fluorescence parameters indicated that this was not prominent in *amiRgox1/2* rosettes (Fig. 3D). Second, glyoxylate has been shown to inhibit RuBisCO activity and activation state *in vitro* (Chastain and Ogren, 1989; Campbell and Ogren, 1990). However, this metabolite did not accumulate in *amiRgox1/2* rosettes while antisensed *GLO4* (GOX) rice plants surprisingly showed a correlation between glyoxylate accumulation and the decrease in CO<sub>2</sub> assimilation and RuBisCO activation state (Lu *et al.*, 2013). Recently *ggt1* mutants exhibiting a decrease in photosynthetic activity after transfer to air accumulated glyoxylate but no changes in RuBisCO activation state were observed and it was concluded that reduced RuBP recycling was the cause of the inhibition (Dellore *et al.*, 2015a). Furthermore, photorespiratory by-pass potato lines expressing *E. coli* glycolate dehydrogenase sub-units in the chloroplast exhibited glyoxylate accumulation and a better photosynthetic activity (Nölke *et al.*, 2014). Third, impaired photorespiration has been shown to decrease photosynthetic ETR and increase NPQ in photorespiratory mutants (Takahashi *et al.*, 2007; Dellore *et al.*, 2015a). A reduced ETR could decrease the thioredoxin-dependent activation of RuBisCO activase (Zhang and Portis, 1999) due to a lowered photosynthetic electron transfer rate, and thus lead to a reduced RuBisCO activity. Fourth, since photorespiration is involved in carbon recycling from 2-PG to 3-PGA, a low (or inhibited) photorespiratory flux might be expected to decrease RuBP regeneration, thus limiting RuBisCO activity. A reduction in C-recycling is probably common to all photorespiratory-limited mutants, and recently this was reported for *ggt1* plants that exhibited a decrease in A<sub>n</sub> but no differences in RuBisCO content, activation state and *in vitro* activity when transferred from HC to air (Dellore *et al.*, 2015a). Although there is still debate concerning the exact mechanism(s) that lead to the decrease in CO<sub>2</sub> assimilation when photorespiratory mutants are transferred from HC to air, it is interesting to note that transgenic lines with an increased photorespiratory cycle capacity exhibit an increased photosynthetic activity. This has been shown by characterizing transgenic lines over-expressing either the H-protein (*FpHL*) or the mitochondrial LPD protein (*PsL*) of the GDC complex (Timm *et al.*, 2013; Timm *et al.*,

2015). These lines exhibited an increased growth rate in air, correlated with a higher  $A_n$  and lower levels of certain photorespiratory metabolites. Perhaps, photorespiratory C-recycling was improved in these lines by alleviating a limiting step in the photorespiratory cycle.

This was not the case in the *amiRgox1/2* plants, in which photorespiratory C-recycling appeared to be severely inhibited. Indeed, after transfer to air there was a 730-fold increase in glycolate levels in *amiRgox1/2* rosettes (Fig. 5) and almost 50% of their daily assimilated carbon was found to accumulate in the glycolate-C1 and -C2 positions (Fig. 4B). Therefore, photorespiratory C-recycling was severely limited in these low GOX activity leaves and a major consequence of this was a negative impact on plant growth. After transfer from HC to air, *amiRgox1/2* plant growth was reduced and leaves became noticeably paler, while chlorotic/bleached spots developed on old leaves that eventually became yellow after 5 days (Fig. 2A, Supplemental Fig. S2). A similar developmental phenotype has been reported for *shmt1* and *glyk1* mutants in which  $\text{CO}_2$  assimilation was reduced and  $\text{CO}_2$  compensation point doubled when plants were transferred from HC to air (Timm *et al.*, 2012). However, metabolite levels were not reported for these mutants.

### **Decreased photorespiratory activity in *amiRgox1/2* leads to altered C-allocation and impacts plant metabolite levels after a HC-to-air transfer**

Decreased photorespiratory activity and C-assimilation in the *amiRgox1/2* line after transfer from HC to air was accompanied by an altered allocation of daily assimilated carbon (Fig. 4). Indeed, as stated earlier, glycolate was a major sink of newly assimilated carbon in *amiRgox1/2* rosettes after their transfer to air. This had a negative impact on C allocated to sugars, certain organic acids and major amino acids (Fig. 4). Indeed, sugars received only 33% of the total assimilated carbon measured in *amiRgox1/2* whereas this value was 58% and 45% for WT and *compl* lines, respectively (Fig. 4B). Surprisingly, fumarate of Col-0 and *compl* lines contained 22% and 36% of measured  $^{13}\text{C}$  label, respectively, while only 5% of the total  $^{13}\text{C}$  label was found in the fumarate of *amiRgox1/2* rosettes (Fig. 4B). A similar trend was also observed for C-allocation to oxaloacetate and to a lesser extent to malate. Although amino acids were poorly  $^{13}\text{C}$ -labelled compared to sugars and organic acids, again a similar reduction in C-allocation to Asp and Glu was observed in the *amiRgox1/2* line compared to Col-0 and *compl* plants (Fig. 4C). In the light, the TCA cycle appears to function mainly in a non-cyclic manner (for a review see Sweetlove *et al.*, 2010). Indeed, labeling experiments

with either  $^{13}\text{C}_1$  or  $^{13}\text{C}_3$ -pyruvate in *Xanthium strumarium* showed that the TCA cycle functioned as two branches in the light: oxaloacetate/malate to produce fumarate, and citrate/isocitrate/2-oxoglutarate for glutamate biosynthesis (Tcherkez *et al.*, 2009). While labeling studies using *Brassica napus* suggesting that stored, unlabeled citrate from the previous day was remobilized to make the 2-oxoglutarate required for Glu biosynthesis (Gauthier *et al.*, 2010). In good agreement with these previous observations, no C-allocation to citrate C2/C4 positions was detected after 5 h of  $^{13}\text{CO}_2$  labeling after transfer to air and only <1% of total  $^{13}\text{C}$  was found in Glu C-positions for all lines (Fig. 4, Supplemental Table S4). The high C-allocation (22 to 36%) to fumarate in Col-0 and *compl* lines (Fig. 4B) suggested that fumarate was a major carbon sink of the TCA cycle in the light, as already proposed (Tcherkez *et al.*, 2009). Therefore, low C-allocation to fumarate could be interpreted as a lower C-allocation to the TCA cycle in the *amiRgox1/2* rosettes perhaps because less newly assimilated C was allocated to glycolysis to feed the TCA cycle. Indeed, TCA cycle decarboxylation in the light and glycolysis were both down-regulated in *Xanthium strumarium* during a short-term decrease of photorespiratory activity through changes in the  $\text{CO}_2/\text{O}_2$  ratio of air (Tcherkez *et al.*, 2008). In *Glycine max*, leaf citrate, succinate and fumarate contents were progressively decreased after 1, 5 and 10 hours of transfer from air-to-HC in the light, perhaps reflecting a lower TCA cycle activity in response to a decreased photorespiratory activity (Sicher, 2013). Therefore, the differences in C-allocation to TCA cycle organic acids between *amiRgox1/2* and control plants after transfer from HC to air probably reflect a negative impact of the low photorespiratory activity on glycolytic C-flow to the TCA cycle. However, perhaps surprisingly, GC-MS analyses of whole rosette leaves showed an increase in succinate, and to a lesser extent malate in the *amiRgox1/2* line after 5 days in air compared to WT and *compl* lines while fumarate and pyruvate levels remained unchanged (Supplemental Table S5). Therefore, the total relative levels of leaf TCA-cycle-related organic acids did not mirror the observed  $^{13}\text{C}$ -allocation of newly assimilated carbon. Perhaps acclimation to air of the photorespiratory *amiRgox1/2* mutant could result in the production of organic acids from alternative pathways involving amino acids. Indeed, this hypothesis could be supported by the accumulation of soluble amino acids in *amiRgox1/2* rosette leaves that appeared to be coupled to a decrease in soluble protein content, including RuBisCO amounts per leaf area in the old leaves, after the transfer of *amiRgox1/2* leaves to air (Figs. 6 and 7). In this way, succinate might be produced from Glu via the GABA shunt while the increase in 2-hydroxyglutarate might indicate organic acid production via lysine catabolism (Engqvist *et al.*, 2011; Boex-Fontvieille *et al.*, 2014). Interestingly, the *shm1-1*



mutant of *Arabidopsis* also showed a large increase in D-2-hydroxyglutarate levels when they were transferred from high CO<sub>2</sub> conditions to air after 6 days. It was proposed that this increase might reflect in part the induction of an active senescence program in the *shm1-1* plants (Kuhn *et al.*, 2013). Indeed, *shm1-1* rosettes develop a similar photorespiratory phenotype to *amiRgox1/2* plants when transferred from HC to air. An induction of amino acid catabolic reactions in the transferred *amiRgox1/2* plants might be indicated also by the increased putrescine, urea, and 2-hydroxyglutarate levels (Supplemental Table S5). The increase in the amount of lactate, the decrease in raffinose content, and the absence of decreases in glucose and fructose after 1 day also indicate that *amiRgox1/2* metabolism is modified compared to control plants after transfer to air from HC.

### **The HC-to-air photorespiratory phenotype of *amiRgox1/2* triggers senescence-related symptoms in old leaves**

After transfer from HC-to-air, old rosette leaves of *amiRgox1/2* plants developed chlorotic/bleached spots and after 5 days they had become yellow (Fig. 2A, Supplemental Fig. S2). Such leaves contained decreased protein (including RuBisCO) and chlorophyll amounts per leaf area, and increased total soluble amino acid levels, with 55% being glutamine (Fig.7), compared to the equivalent leaves of transferred Col-0 and *compl* leaves. There was a large increase in the senescence marker gene *SAG12* only in the old rosette leaves of *amiRgox1/2* plants. The induction of *SAG12* expression, the degradation of chlorophylls and proteins (especially RuBisCO) are all senescence-related symptoms (for reviews, see Diaz *et al.*, 2005; Avice and Etienne, 2014). Dark-induced senescence in *A. thaliana* Col-0 plants resulted in a lower RuBisCO content (Keech *et al.*, 2010). An acceleration of dark-induced senescence by the overexpression of maize NADP-malic enzyme in *A. thaliana* resulted in decreased chlorophyll, total protein and RuBisCO contents and a strong decrease of fumarate levels but increased amounts of succinate and malate (Fahnenstich *et al.*, 2007). This dark-induced senescence phenotype was suggested to be triggered by C-deprivation and partially due to low organic acid levels (Fahnenstich *et al.*, 2007). In *Hordeum vulgare*, natural senescence was accompanied by decreased RuBisCO and soluble protein contents and total amino acids levels in the old leaves (Avila-Ospina *et al.*, 2015). However, in *Arabidopsis thaliana*, leaf natural senescence led to increased levels of Leu, Val, Ile, Thr, Ser, Ala, Trp, Tyr, Asn, Pro, Gly and Phe, and decreased amounts of fumarate, malate, 2-oxoglutarate and succinate in the older leaves (Watanabe *et al.*, 2013). Therefore, the changes occurring in old *amiRgox1/2* leaves

after transfer to air from HC suggest an induced onset of senescence. After transfer from HC to air, the decrease in C-assimilation and the strongly reduced C-allocation towards TCA cycle organic acids, sugars and amino acids in the *amiRgox1/2* line might be expected to trigger a C-deprived dark type of senescence. However, the observed changes in amino acid levels are perhaps in agreement with the induction of an early natural senescence. Although, it seems clear that senescence has been induced in the transferred *amiRgox1/2* plants, the observed symptoms probably reflect a specific situation due to the age and growth conditions of the plants.

To conclude, we have shown that *GOX1* and *GOX2* share a redundant photorespiratory function in *A. thaliana* rosette leaves. A reduced/blocked photorespiratory cycle due to the knock-down of both *GOX1/2* led to inhibition reduction of photosynthetic C-assimilation after a HC-to-air transfer and produced a lower allocation of newly assimilated C to sugars, TCA cycle organic acids and amino acids. After transfer to air, old *amiRgox1/2* leaves developed clear senescence symptoms (yellow leaves with reduced chlorophyll and RuBisCO contents, and higher levels of soluble amino acids). We propose that low C-assimilation and modified C-allocation to important metabolic processes including the TCA cycle triggers leaf senescence. Therefore, photorespiration plays a major role in maintaining optimal primary metabolic activities, including photosynthesis, the TCA cycle and amino acid homeostasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Material and growth conditions

*Arabidopsis thaliana* wild-type (WT) ecotype Columbia (Col-0) was used as control plants in all experiments. T-DNA insertion mutants of *GOX1* (At3g14420), SAIL 117-G11 (*gox1-1*) and *GOX2* (At3g14415), Salk 025574 (*gox2-1*) and Salk 044052 (*gox2-2*), were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (<https://abrc.osu.edu/>). Plants were grown in air (380  $\mu\text{L CO}_2\cdot\text{L}^{-1}$  air) or high  $\text{CO}_2$  (HC: 3000  $\mu\text{L CO}_2\cdot\text{L}^{-1}$  air), under a 8h /16h day/night cycle (20°C/18°C), in growth chambers (at a light intensity of 200  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) on commercial peat substrate fertilized with 1  $\text{kg/m}^3$  of a 17:10:14 N/P/K mixture. Transfer experiments were carried out on 6 or 7-week-old plants grown in HC and transferred to ambient air at 200  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  or 350  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of light intensity at the middle of the day period. If not specified, all samples were harvested at the middle of the photoperiod, frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder and stored at -80°C.

### Construction and complementation of an artificial microRNA line

An artificial microRNA (amiR) was designed to target Arabidopsis *GOX1* and *GOX2* using the web microRNA designer software (WMD3: <http://wmd3.weigelworld.org>). The amiR sequence of the *miR319a* gene of pRS300 was modified by the *GOX* amiR sequence, TAACATACGAAGCTAAGCCAT, by multiple PCRs as described in Schwab *et al.*, 2006, using primers described in Supplemental Table S1. The resulting DNA (*amiRGOX1/2*) was cloned into pGEM-T Easy<sup>®</sup>, sequenced (by MWG Operon, Eurofins, Germany) and transferred into pENTR2B using NotI and EcoRI restriction sites. It was further cloned into pAlligator2, so as to be under the control of the 35S *CaMV* promoter, by using the LR reaction of the Gateway<sup>®</sup> cloning system to generate pAlligator2-*amiRGOX1/2*. Agrobacterium strain GV3101 was transformed pAlligator2-*amiRGOX1/2*, and used to transform Arabidopsis Col-0 plants by floral-dip (Clough and Bent, 1998). Transformed *amiRgox1/2* seed were selected using epifluorescence microscopy due to their capacity to emit green fluorescence, since pAlligator2 contains a GFP coding sequence under the control of the seed tegument-specific promoter *At2S3* (Bensmihen *et al.*, 2004). The homozygous *amiRgox1/2* line was complemented (*compl* line) with the ORF of a *ZmGO1* cDNA (see below) under the control of a 1 kb DNA promoting region (-1000 to +3) of Arabidopsis

*SHMT1* (At4g37930). To achieve this, the *SHMT1* promoter sequence was PCR-amplified using primers with added restriction sites (promSHMT1HindIII-f and promSHMT1SpeI-r, see Supplemental Table S1) and genomic DNA extracted from Arabidopsis rosette leaves as described in Edwards *et al.*, 1991. The resulting PCR product was cloned into pGEM-T Easy®, sequenced and subcloned into pK7WG by HindII-SpeI digestion to produce pK7WG-promSHMT1. Then, attB Gateway® recombination sites were added to the 5' and 3' ends of the *ZmGO1* cDNA open reading frame (Clone ZM\_BFc0135O12 ordered from Arizona Genomics Institute) by two consecutive PCRs (using primers GW-ZmGO1-f/GW-ZmGO1-r then GateWay-f/GateWay-r, see Supplemental Table S1), and the resulting DNA was cloned first into pDONR207, and then into pK7WG-promSHMT1 using the Gateway® cloning system to generate pK7WG-promSHMT1-ZmGO1. Homozygous *amiRgox1/2* plants were transformed with pK7WG-promSHMT1-ZmGO1 and *compl* lines were selected by their resistance to kanamycin. Homozygous lines containing a single insertion were selected by successive rounds of self crossing and antibiotic selection on half MS medium agar plates.

### Isolation of T-DNA mutants

Homozygous single T-DNA GOX mutant lines were identified by PCR-screening using rosette leaf DNA extracts (Edwards *et al.*, 1991) and the following primer pairs (see Supplemental Table S1): *gox1-f/gox1-r* for *gox1-1*; *gox2-f/gox2-r* for *gox2-1* and *gox2-2* to amplify the Col-0 allele and *gox1-f/LB1-Salk* for *gox1-1*; *LBb1-Salk/gox2-r* for *gox2-1*; *gox2-f/LBb1-Salk* for *gox2-2* to amplify the T-DNA allele.

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 200 mg of 5-week-old rosette leaves using TRIzol® as in Jossier *et al.*, 2009. One µg of total RNA was treated with DNase (RQ1 endonuclease) and 500 ng of DNase-treated RNA were reverse transcribed using reverse transcriptase (IM-PromII™), according to the supplier's protocols (Promega). The resulting matrices were diluted 3 times in sterile water. Quantitative RT-PCR analyses were performed using a Light Cycler 480 Real-Time PCR System and SYBR green (Roche Diagnostics). Transcript levels were normalized to *ACTIN 2*. Primers for *GOX1*, *GOX2*, *ZmGO1*, *SAG12* and *ACTIN 2* are given in Supplemental Table S1. Primers for *GOX3*, *HAOX1* and *HAOX* are as described in Rojas *et al.*, 2012.

## GOX activity

GOX activity was measured using soluble protein extracts from rosette leaves of 5-week-old air-grown plants or 6-week-old HC grown plants as described in Deller *et al.*, 2015b. Three hundred  $\mu\text{g}$  of proteins were used for WT, *gox2-1*, *gox2-2*, *gox1-1* and *compl* lines and 600  $\mu\text{g}$  of proteins were used for *amiRgox1/2* plants.

## SDS-PAGE and western-blot analyses

Soluble protein extracts were separated on SDS-PAGE gels (10% acrylamide) and proteins were detected by Coomassie blue staining (Laemmli UK, 1970). For relative RuBisCO quantification, the same volume of leaf protein extracted in a Bicine-HCl buffer pH 8, with respect to leaf surface (surface approximated from photographs using ImageJ) was separated by SDS-PAGE, and RuBisCO large subunit amounts were quantified using the ImageJ gel Tool analyzer (ImageJ.nih.gov/ij/). For western-blot analyses, 15  $\mu\text{g}$  of leaf soluble proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. GOX protein was probed overnight at 4°C with a commercial rabbit polyclonal antibody serum raised against GOX1/2/3 peptides (AS14 2772, Agrisera) diluted 1/1000, according to the manufacturer's protocol. GOX was revealed by enhanced chemoluminescence using chemoluminescent peroxidase substrate-3 (Sigma-Aldrich).

## <sup>13</sup>C-labeling of Arabidopsis rosettes

One hour after the beginning of the photoperiod, 3 plants of the same genotype grown for 7-weeks in HC were directly transferred to a home-made open system gas exchange chamber (volume of 0.8 m<sup>3</sup>). The chamber was connected to a LiCOR system (LI 6400XT, LiCOR) to measure photosynthesis, transpiration rate and leaf temperature. Foliar leaf surface was calculated using ImageJ. Air flow was regulated at 40 L.h<sup>-1</sup> using a refrigerated system to maintain humidity at 65% and leaf temperature at 23°C. Plants were 10 min dark-acclimated followed by a 45 min light period (at 200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) to measure plant gas exchange parameters before labeling for 5 h using air with standard CO<sub>2</sub> or 99% enriched <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> (Euriso-top®). Samples were harvested in the light after freeze-clamping with liquid nitrogen. These two labeling experiments (standard CO<sub>2</sub> or 99% enriched <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>) were carried

out for each genotype, and for each condition: direct transfer from HC, one day and after five days after transfer from HC to air.

### <sup>13</sup>C NMR analyses

Polar metabolites of frozen samples from standard CO<sub>2</sub> or 99% enriched <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> labeling experiments were extracted with 900 µL of 70% (v/v) perchloric acid, containing 250 µmoles of maleate as an internal standard. After a 15 min, 15 000 g centrifugation at 4°C, the supernatant was removed and stored at 4°C and the pellet was further extracted with 3 mL of 2% (v/v) perchloric acid. After another 15 min, 15 000 g centrifugation at 4°C, the second supernatant was mixed with the first and 10 mL of water was added. The pH was adjusted to 5 using 5M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. After lyophilisation, the dried powder was resuspended in 1 mL of water. The pH was adjusted to 7 using 5M KOH then 50 µL D<sub>2</sub>O and 2 µL of 1 mM MnSO<sub>4</sub> were added. NMR analyses were carried out using a 400 MHz NMR spectrometer (Bruker) and 600 µL of each resuspended sample. The <sup>13</sup>C-NMR acquisition sequence was: 9.75 µs of pulse at 42W (90°), 15 s of relaxation, acquisition for 1.36 s with a sweep width of 24 kHz. Proton signals were decoupled by applying 9W during acquisition and 0.17 W during relaxation, following the Waltz sequence. 2600 scans were performed and signals were digitalized in 65 000 data points. Spectra were referenced to tetramethylsilane (0 ppm of the spectrum). Metabolite positions were identified by comparison with the chemical shift of authentic standards analyzed with the same NMR sequence. Absolute <sup>13</sup>C quantification of all positions was achieved by peak intensity normalization to the known amount of maleate and to the response of the chemical functions of Thr. Percentage molar <sup>13</sup>C-allocation for a position *i* (<sup>13</sup>C A<sub>*i*</sub>) compared to the sum of *n* metabolite positions identified in the NMR spectra is given by the relationship:

$$^{13}\text{C} A_i = \frac{^{13}\text{C} S_i - ^{12}\text{C} S_i}{\sum_{k=1}^n ^{13}\text{C} S_k - \sum_{k=1}^n ^{12}\text{C} S_k}$$

With <sup>13</sup>C S<sub>*i*</sub> the absolute quantity of <sup>13</sup>C detected after 5h of labeling and <sup>12</sup>C S<sub>*i*</sub> the absolute quantity of <sup>13</sup>C at natural abundance after 5h without labeling.

### Leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements

Gas exchange and chlorophyll fluorescence measurements were carried out using 2 cm<sup>2</sup> of fully expanded leaves clamped in a gas exchange chamber (LCF 6400-40, LiCOR) connected to a portable measuring system (LI 6400XT, LiCOR) as described in Dellerio *et al.*, 2015a.

## Metabolite analyses by GC-MS and HPLC

Relative metabolite levels and quantitative amino acid amounts were analyzed by GC-MS and HPLC, respectively, using cold-methanol extracts from leaves as described in Noctor *et al.*, 2007. For GC-MS analyses, whole rosette leaves were used, while only old leaves were used for HPLC analyses.

## Protein and chlorophyll contents per leaf area

Soluble proteins were extracted in 100 mM Bicine, pH 8 supplemented with an anti-protease cocktail (Complete-Mini Free-EDTA, Roche) and chlorophylls were acetone-extracted from 2 old leaves of plants grown in HC for 6 weeks and transferred either 1 or 5 days to air, with the same volume of extraction buffer with respect to the leaf surface (approximated using ImageJ). Chlorophyll amounts were calculated from absorbance values at 663 nm and 646 nm (Porra *et al.*, 1989). Leaf soluble protein levels were determined with Bradford reagent (Sigma-Aldrich) and a calibration curve using bovine serum albumin.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Françoise Gilard and Caroline Mauve of the IPS2 Métabolisme-Métabolome facility for their help with the GC-MS, NMR and HPLC analyses. We also thank Graham Noctor (IPS2) for providing seeds of the SAIL 117-G11 (*gox1-1*) mutant line.



## LITERATURE CITED

- Anderson LE**, (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochim Biophys Acta* **235**: 237-244
- Avice J-C, Etienne P** (2014) Leaf Senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot* **65**: 3813–3824
- Avila-Ospina L, Marmagne A, Talbotec J, Krupinska K, Masclaux-Daubresse C** (2015) The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. *J Exp Bot* **66**: 2013–2026
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* **15**: 330–336
- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Lett* **561**: 127–131
- Bloom AJ** (2015) Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynth Res* **123**: 117–128
- Boex-Fontvieille E, Gauthier P, Gilard F, Hodges M, Tcherkez G** (2013) A new anaplerotic respiratory pathway involving lysine biosynthesis in isocitrate dehydrogenase-deficient Arabidopsis mutants. *New Phytol* **199**: 673-682.
- Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H** (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in Arabidopsis, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* **17**: 2413–2420
- Campbell WJ, Ogren WL** (1990) Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts. *Photosynth Res* **23**: 257–268
- Chastain CJ, Ogren WL** (1989) Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation state in vivo. *Plant Cell Physiol* **30**: 937–944
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Dellero Y, Lamothe-Sibold M, Jossier M, Hodges M** (2015a) *Arabidopsis thaliana ggt1* photorespiratory mutants maintain leaf carbon/nitrogen balance by reducing RuBisCO content and plant growth. *Plant J* **83**: 1005–1018

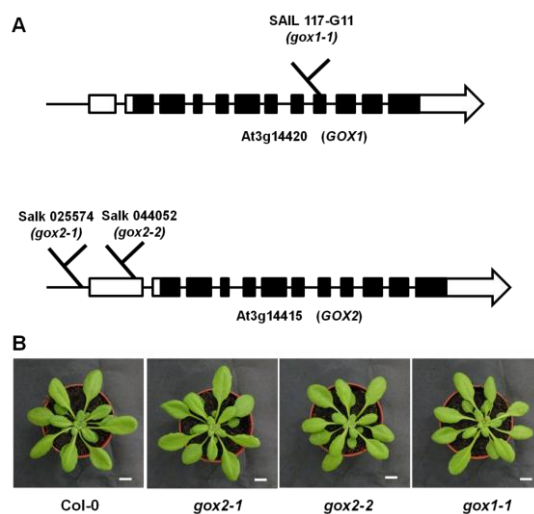
- Dellero Y, Mauve C, Boex-Fontvieille E, Flesch V, Jossier M, Tcherkez G, Hodges M** (2015b) Experimental evidence for a hydride transfer mechanism in plant glycolate oxidase catalysis. *J Biol Chem* **290**: 1689–1698
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C** (2005) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**: 74–83
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl Acid Res* **19**: 1349
- Engel N, Ewald R, Gupta KJ, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe H** (2011) The presequence of *Arabidopsis* serine hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria. *Plant Physiol* **157**: 1711–1720
- Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu U, Morgenthal K, Weckwerth W, Parnik T, Keerberg O, Bauwe H** (2007) Deletion of glycine decarboxylase in *Arabidopsis* is lethal under nonphotorespiratory conditions. *Plant Physiol* **144**: 1328–1335
- Engqvist MK, Kuhn A, Wienstroer J, Weber K, Jansen EE, Jakobs C, Weber AP, Maurino VG** (2011) Plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase participates in the catabolism of lysine especially during senescence. *J Biol Chem* **286**: 11382–11390
- Engqvist MK, Schmitz J, Gertzmann A, Florian A, Jaspert N, Arif M, Balazadeh S, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Maurino VG** (2015) GLYCOLATE OXIDASE3, a glycolate oxidase homolog of yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase, supports L-lactate oxidation in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **169**:1042–1061
- Esser C, Kuhn A, Groth G, Lercher MJ, Maurino VG** (2014) Plant and animal glycolate oxidases have a common eukaryotic ancestor and convergently duplicated to evolve long-chain 2-hydroxy acid oxidases. *Mol Biol Evol* **31**: 1089–1101
- Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanor MI, Andreo CS, Fernie AR, Drincovich MF, Flugge U-I, Maurino VG** (2007) Alteration of organic acid metabolism in *Arabidopsis* overexpressing the Maize C4 NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol* **145**: 640–652
- Gauthier PPG, Bligny R, Gout E, Mahé A, Nogués S, Hodges M, Tcherkez GGB** (2010) In folio isotopic tracing demonstrates that nitrogen assimilation into glutamate is mostly independent from current CO<sub>2</sub> assimilation in illuminated leaves of *Brassica napus*. *New Phytol* **185**: 988–999

- Hanson AD, Gregory JF** (2011) Folate biosynthesis, turnover, and transport in plants. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 105–125
- Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Ajrmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M** (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **59**: 316–328
- Kebeish R, Niessen M, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch H-J, Rosenkranz R, Stäbler N, Schönfeld B, Kreuzaler F, Peterhänsel C** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech* **25**: 593–599
- Keech O, Pesquet E, Gutierrez L, Ahad A, Bellini C, Smith SM, Gardestrom P** (2010) Leaf senescence is accompanied by an early disruption of the microtubule network in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**: 1710–1720
- Kuhn A, Engqvist MKM, Jansen EEW, Weber APM, KJakobs C, Maurino VG** (2013) D-2-hydroxyglutarate metabolism is linked to photorespiration in the *shm1-1* mutant. *Plant Biol* **15**: 776–784
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Lu Y, Li Y, Yang Q, Zhang Z, Chen Y, Zhang S, Peng X-X** (2013) Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating Rubisco in rice. *Physiol Plant* **150**: 463–476
- Noctor G, Bergot G, Mauve C, Thominet D, Lelarge-Trouverie C, Prioul J-L** (2007) A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* **3**: 161–174
- Nölke G, Houdelet M, Kreuzaler F, Peterhänsel C, Schillberg S** (2014) The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotech J* **12**: 734–742
- Pick TR, Brautigam A, Schulz MA, Obata T, Fernie AR, Weber APM** (2013) PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 3185–3190
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384–394

- Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, Antonicelli GE, Rasche N, Lüder F, Weckwerth W, Jahn O** (2007) Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* **19**: 3170–3193
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Wang K, Ryu C-M, Kaundal A, Mysore KS** (2012) Glycolate oxidase modulates reactive oxygen species-mediated signal transduction during nonhost resistance in *Nicotiana benthamiana* and Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 336–352
- Ros R, Muñoz-Bertomeu J, Krueger S** (2014) Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci* **19**: 564–569
- Schwab R, Ossowski S, Riestter M, Warthmann N, Weigel D** (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**: 1121–1133
- Sicher R** (2013) Combined effects of CO<sub>2</sub> enrichment and elevated growth temperatures on metabolites in soybean leaflets: evidence for dynamic changes of TCA cycle intermediates. *Planta* **238**: 369–380
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of Arabidopsis. Mutants of the cruciferous plant Arabidopsis thaliana lacking glycine decarboxylase activity. *Nature* **280**: 833–835
- Somerville CR, Ogren WL** (1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 2684–2687
- Somerville CR, Ogren WL** (1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol* **67**: 666–671
- Somerville CR, Ogren WL** (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem J* **202**: 373–380
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Sci* **15**: 462–470
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M** (2007) Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of Photosystem II by suppression of repair but not acceleration of damage processes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**: 487–494
- Tcherkez G, Bligny R, Gout E, Mahé A, Hodges M, Cornic G** (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 797–802

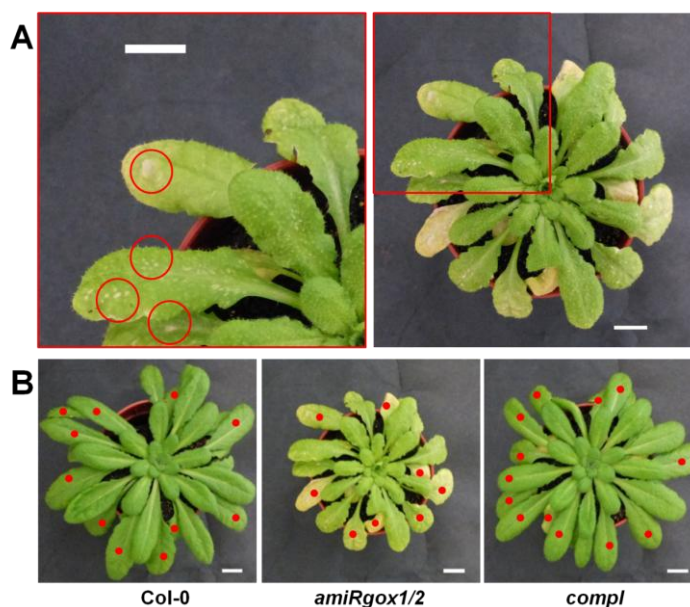
- Tcherkez G, Mahe A, Gauthier P, Mauve C, Gout E, Bligny R, Cornic G, Hodges M** (2009) *In folio* respiratory fluxomics revealed by  $^{13}\text{C}$  isotopic labeling and H/D isotope effects highlight the noncyclic nature of the tricarboxylic acid “cycle” in illuminated leaves. *Plant Physiol* **151**: 620–630
- Timm S, Bauwe H** (2013) The variety of photorespiratory phenotypes – employing the current status for future research directions on photorespiration. *Plant Biol* **15**: 737–747
- Timm S, Florian A, Arrivault S, Stitt M, Fernie AR, Bauwe H** (2013) Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Lett* **586**: 3692–3697
- Timm S, Florian A, Jahnke K, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Bauwe H** (2011) The hydroxypyruvate-reducing system in *Arabidopsis*: Multiple enzymes for the same end. *Plant Physiol* **155**: 694–705
- Timm S, Mielewczik M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H** (2012) High-to-low  $\text{CO}_2$  acclimation reveals plasticity of the photorespiratory pathway and indicates regulatory links to cellular metabolism of *Arabidopsis*. *PLoS One* **7**: e42809
- Timm S, Wittmiß M, Gamlien S, Ewald R, Florian A, Frank M, Wirtz M, Hell R, Fernie AR, Bauwe H** (2015) Mitochondrial dihydrolipoyl dehydrogenase activity shapes photosynthesis and photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **27**: 1968–1984
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R** (2013) Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **162**: 1290–1310
- Xu H, Zhang J, Zeng J, Jiang L, Liu E, Peng C, He Z, Peng X** (2009) Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. *J Exp Bot* **60**: 1799–1809
- Yamaguchi K, Nishimura M** (2000) Reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation. *Plant Cell Physiol* **41**: 1397–1406
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP** (2009) High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiol* **149**: 195–204
- Zhang N, Portis AR** (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9438–9443

## SUPPORTING INFORMATION



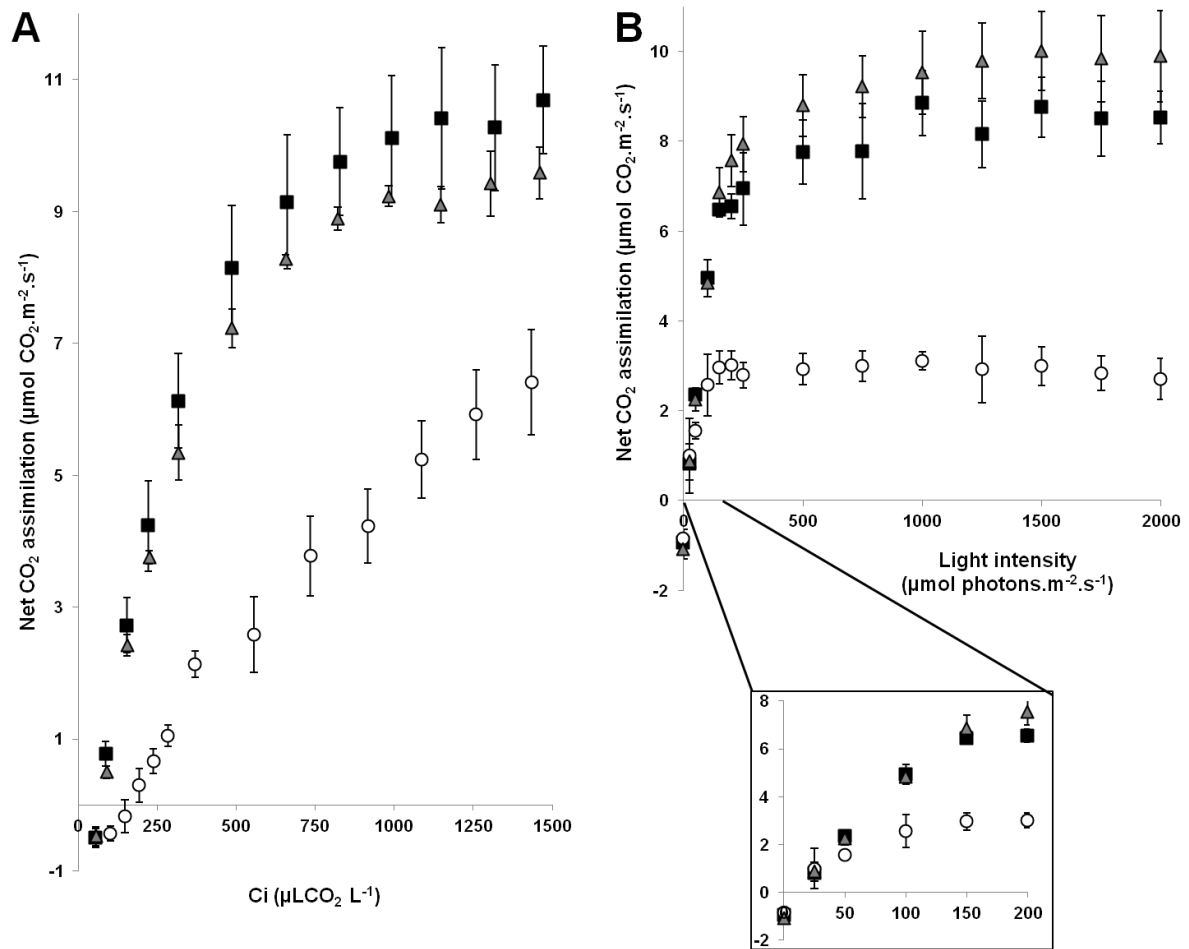
**Figure S1.** T-DNA insertion and growth phenotype of single *gox* mutants.

(A) Map of the T-DNA insertion in the single *gox* lines used in this work. Black boxes represent exons, solid lines introns and white boxes 5' and 3' UTR regions of the gene. (B) Growth phenotype of 5-week-old single *gox2-1*, *gox2-2* and *gox1-1* mutants grown in air under short days at a light intensity of 200  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (White bar = 1cm).



**Figure S2.** Old rosette leaves of Col, *amiRgox1/2* and *compl* lines after five days transferred from high  $\text{CO}_2$  to air.

(A) Morphological phenotype of old rosette leaves from *amiRgox1/2* plants grown in high  $\text{CO}_2$  for 6 weeks and then transferred five days to air. Empty red circles in the enlarged picture (red square) show chlorosis/bleaching-related spots on old rosette leaves. (B) Example of old rosette leaves harvesting for Col, *amiRgox1/2* and *compl* plants after five days transferred from high  $\text{CO}_2$  to air. Filled red circles show leaves that were harvested as "old leaves".



**Figure S3.** CO<sub>2</sub> and light response curves of net CO<sub>2</sub> assimilation rates of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosette leaves after a transfer from high CO<sub>2</sub> to air.

(A) CO<sub>2</sub> response curves were performed at a light intensity of 200 μmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> with C<sub>i</sub> being an approximation of the CO<sub>2</sub> concentration within the chloroplast (expressed in μL.L<sup>-1</sup>). (B) Light response curves were performed at 380 μL CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.

Col-0 (black square), *amiRgox1/2* (white circle) and *compl* (grey triangles) plants were grown for 6 weeks in high CO<sub>2</sub> (3000 μL CO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) before being transferred to air. Values are the mean ±SD (n = 3 independent plants).



**Table S1.** Primers for PCR and cloning.

Primers name	Sequence (5' to 3')
<b><i>amiRGOX1/2</i></b>	
amiRgox1/2-I	GATTTGAATCGCTATCCTTGCAACTCTCTTTTGTATTCCA
amiRgox1/2-II	AGTTGCAAGGATAGCGATTCAAATCAAAGAGAATCAATGA
amiRgox1/2-III	AGTTACAAGGATAGCCATTCAATTCACAGGTCGTGATATG
amiRgox1/2-IV	GAATTGAATGGCTATCCTTGTAACATACATATATATTCCTA
amiRgox1/2-A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
amiRgox1/2-B	GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
<b>Cloning</b>	
promSHMT1HindIII-f	GGAAGCTTCAGCCTGAACATTCCGATTA
promSHMT1SpeI-r	GCACTAGTCATGAACGAGAGAGAGAAGAGA
GW-ZmGO1-f	TACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGGGAGATCACCAATGTC
GW-ZmGO1-r	CAAGAAAGCTGGGTCCTACAAGCGCGACGGGATG
GateWay-f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
GateWay-r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC
<b>RT-PCR</b>	
GOX1-f	GGGACACTCCACGTCCTTC
GOX1-r	AGGCTTGTTTGTGATCTGA
GOX2-f	CACGGTAACCACATTGTCA
GOX2-r	TACGCACGTTTTTGTGATCC
Actine2-8-f	GGTAACATTGTGAGTGGTGG
Actine2-8-r	AACGACCTTAATCTTCATGCT
ZmGO1-f	GTCCGCCGCGGCACCGACGTCTTC
ZmGO1-r	ATCTACAAGCGCGACGGGAT
SAG12-f	GCTTTGCCGGTTTCTGTT
SAG12-r	GTTTCCCTTTCTTTATTTGTGTTG
<b>Genotyping</b>	
gox1-f	AACCTGACCTCGGAAAGATGG
gox1-r	TCTGGTTAACGAGAATATGA
LB1-Sail	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
gox2-f	TTGTTATGTTTCGTCAAGCCC
gox2-r	ATACCATGATGGTTCCAGCAG
LBb1-Salk	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT

**Table S2.** Relative metabolite levels of 5-week old air-grown single *gox2-1*, *gox2-2* and *gox1-1* mutant rosette leaves.

	Col-0	<i>gox2-1</i>	<i>gox2-2</i>	<i>gox1-1</i>
Amino acids				
Aspartic acid	1.00 ± 0.85	0.69 ± 0.89	0.45 ± 0.40	0.44 ± 0.35
Beta-alanine	1.00 ± 0.08	0.91 ± 0.17	0.88 ± 0.08	0.99 ± 0.15
GABA	1.00 ± 0.73	0.32 ± 0.11	0.32 ± 0.10	0.42 ± 0.16
Glutamic acid	1.00 ± 0.62	0.70 ± 0.61	0.51 ± 0.25	0.49 ± 0.20
Glutamine	1.00 ± 0.43	0.76 ± 0.62	0.72 ± 0.45	0.83 ± 0.61
Glycine	1.00 ± 0.39	0.78 ± 0.13	0.75 ± 0.26	0.59 ± 0.14
Isoleucine	1.00 ± 0.08	0.77 ± 0.21	0.88 ± 0.29	0.80 ± 0.31
Leucine	1.00 ± 0.16	0.70 ± 0.25	0.89 ± 0.39	0.72 ± 0.33
Lysine	1.00 ± 0.21	0.71 ± 0.40	0.85 ± 0.37	0.78 ± 0.30
Methionine	1.00 ± 0.27	0.91 ± 0.39	0.72 ± 0.16	0.90 ± 0.28
Phenylalanine	1.00 ± 0.12	0.73 ± 0.31	<b>0.71 ± 0.18</b>	0.71 ± 0.23
Proline	1.00 ± 0.41	0.84 ± 0.38	0.56 ± 0.11	0.85 ± 0.53
Serine	1.00 ± 0.30	0.83 ± 0.46	0.78 ± 0.26	0.61 ± 0.28
Threonine	1.00 ± 0.23	0.73 ± 0.24	0.69 ± 0.15	0.75 ± 0.27
Valine	1.00 ± 0.12	0.79 ± 0.17	0.86 ± 0.22	0.87 ± 0.28
Organic acids				
Citric acid	1.00 ± 0.69	0.39 ± 0.22	0.34 ± 0.15	0.33 ± 0.09
Fumaric acid	1.00 ± 0.31	0.84 ± 0.47	0.76 ± 0.43	0.77 ± 0.30
Glyceric acid	1.00 ± 0.30	0.82 ± 0.28	0.90 ± 0.19	0.82 ± 0.11
Glycolic acid	1.00 ± 0.31	0.80 ± 0.21	0.80 ± 0.29	0.63 ± 0.32
Lactic acid	1.00 ± 0.75	1.06 ± 0.63	1.47 ± 1.10	1.02 ± 0.31
Malic acid	1.00 ± 1.36	0.28 ± 0.34	0.21 ± 0.24	0.18 ± 0.16
Pyruvic acid	1.00 ± 0.46	0.90 ± 0.38	0.82 ± 0.16	0.98 ± 0.68
Succinic acid	1.00 ± 0.88	0.58 ± 0.42	0.53 ± 0.46	0.46 ± 0.36
Sugars				
Arabinose	1.00 ± 0.15	0.79 ± 0.12	<b>0.78 ± 0.03</b>	<b>0.75 ± 0.03</b>
Fructose	1.00 ± 0.35	1.03 ± 0.27	0.88 ± 0.38	0.74 ± 0.19
Galactose	1.00 ± 0.32	0.73 ± 0.30	0.82 ± 0.46	0.79 ± 0.18
Glucose	1.00 ± 0.40	0.96 ± 0.31	0.85 ± 0.30	0.89 ± 0.16
Raffinose	1.00 ± 0.15	0.87 ± 0.31	0.71 ± 0.32	0.92 ± 0.37
Ribose	1.00 ± 0.27	0.75 ± 0.10	0.74 ± 0.08	0.71 ± 0.06
Sucrose	1.00 ± 0.12	0.93 ± 0.25	0.89 ± 0.16	0.86 ± 0.08
Trehalose	1.00 ± 0.76	1.02 ± 0.69	1.76 ± 1.15	0.87 ± 0.45
Xylose	1.00 ± 0.25	0.89 ± 0.27	0.74 ± 0.17	0.83 ± 0.05
Miscellaneous				
Ascorbic acid	1.00 ± 0.54	1.17 ± 0.26	0.93 ± 0.79	1.20 ± 0.42
Benzoic acid	1.00 ± 0.62	0.85 ± 0.31	0.76 ± 0.27	0.88 ± 0.24
Erythritol	1.00 ± 0.11	1.13 ± 0.43	0.95 ± 0.27	0.95 ± 0.07
Ethanolamine	1.00 ± 0.31	0.67 ± 0.13	0.63 ± 0.09	0.31 ± 0.11
Galactinol	1.00 ± 0.55	1.27 ± 0.46	1.20 ± 0.44	1.24 ± 0.34
Galactonic acid	1.00 ± 0.09	1.03 ± 0.17	0.86 ± 0.14	1.07 ± 0.18
Glycerol	1.00 ± 0.42	0.89 ± 0.43	0.70 ± 0.12	0.72 ± 0.08
Levogluconan	1.00 ± 0.39	1.40 ± 0.53	1.36 ± 0.54	1.54 ± 0.54
Mannitol	1.00 ± 0.24	1.97 ± 2.04	2.14 ± 1.03	1.19 ± 0.71
Myo-inositol	1.00 ± 0.10	0.89 ± 0.31	0.82 ± 0.35	0.85 ± 0.14
Phosphoric acid	1.00 ± 0.74	0.74 ± 0.77	0.48 ± 0.32	0.55 ± 0.36
Pipecolic acid	1.00 ± 0.49	0.42 ± 0.40	<b>0.29 ± 0.16</b>	0.57 ± 0.34
Putrescine	1.00 ± 0.17	0.80 ± 0.26	0.85 ± 0.13	0.96 ± 0.08
Shikimic acid	1.00 ± 0.03	0.96 ± 0.22	<b>0.79 ± 0.15</b>	0.95 ± 0.14
Sitosterol	1.00 ± 0.11	1.02 ± 0.21	0.89 ± 0.16	0.91 ± 0.15
Sorbitol	1.00 ± 0.32	0.93 ± 0.21	0.95 ± 0.32	0.98 ± 0.30
Threonic acid	1.00 ± 0.36	0.79 ± 0.24	0.81 ± 0.17	0.81 ± 0.13
Urea	1.00 ± 0.60	0.79 ± 0.45	1.24 ± 0.34	1.21 ± 0.48

Rosette leaves were sampled at midday and metabolites were extracted for analyses by GC-MS. Relative metabolite contents are shown with the corresponding Col-0 levels arbitrarily set to 1. Error bars represent the ±SD (n=4 independent plants). Significantly different values from Col-0 are in bold (t-test, P<0.05).

**Table S3.** Gas exchange measurements and chlorophyll fluorescence parameters of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosette leaves grown in high CO<sub>2</sub>.

	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>
	$\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		
A <sub>n</sub>	9.49 ±0.65	9.58 ±0.23	10.30 ±0.65
R <sub>dark</sub>	-0.98 ±0.13	-1.02 ±0.07	-1.06 ±0.15
	$\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$		
Stomatal conductance	0.059 ±0.004	0.062 ±0.012	0.066 ±0.008
	Arbitrary units		
Fv/Fm	0.814 ±0.004	0.809 ±0.006	0.817±0.005
ETR	36.75 ±1.39	37.46 ±2.14	39.45 ±1.71
NPQ	0.77 ±0.10	0.68 ±0.11	0.72 ±0.07

Plants were grown during 7 weeks in high CO<sub>2</sub> (3000  $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and measurements were carried out at 1900  $\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$  CO<sub>2</sub> (the limit of the LiCOR system). Net CO<sub>2</sub> assimilation rate (A<sub>n</sub>), dark respiration rate (R<sub>dark</sub>), stomatal conductance, F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> ratio, photosynthetic electron transfer rate (ETR) and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching (NPQ) of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* rosettes leaves. Values were measured after a 1 h illumination period. Values are means ±SD (n = 3 independent plants).

**Table S4.** % molar  $^{13}\text{C}$  allocation in C-atom positions detected by  $^{13}\text{C}$ -NMR of whole intact rosette leaf extracts of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants after  $^{13}\text{C}$ -labelling with 99% enriched  $^{13}\text{CO}_2$  for 5 h upon a direct transfer from HC (Tdir) to air or 1 (T1) and 5 days (T5) after transfer.

	T dir			T 1 day			T 5 days		
	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>
Asn C2	0.26	0.21	0.71	0.18	0.03	0.19	0.08	0.15	0.17
Asp C2	0.81	0.62	1.68	0.65	0.22	0.64	0.62	0.33	0.59
Asp C3	0.56	0.11	1.32	0.53	0.07	0.79	0.42	0.07	0.75
Citrate C2/C4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.34
F C1	1.37	1.16	0.70	1.50	1.04	0.95	1.31	0.89	1.08
F C6	1.69	1.16	0.69	1.92	1.41	1.23	1.72	1.19	1.40
F6P	2.52	2.00	2.17	3.68	2.30	2.38	5.02	2.68	4.26
F C2 furanose	0.65	0.41	0.45	0.76	0.52	0.60	0.68	0.34	0.72
Fum C1/C4	10.30	4.43	13.89	7.12	1.95	11.83	6.87	1.82	9.20
Fum C2/C3	22.13	6.68	31.56	11.15	2.15	27.35	8.87	0.49	16.77
Fβ C3 pyranose	1.90	1.57	1.62	2.17	1.18	1.43	2.02	0.93	1.59
Fβ C4 pyranose	1.40	1.04	2.01	1.40	0.88	1.43	1.09	0.57	1.22
Fβ C5 pyranose	1.46	1.23	1.32	1.44	0.94	1.17	1.42	0.80	1.31
Gln C2	0.06	0.22	0.27	0.05	0.01	0.18	0.01	0.03	0.12
Gln C3	0.06	0.39	0.32	0.03	0.01	0.16	0.06	0.05	0.17
Gln C4	0.04	0.57	0.00	0.03	0.08	0.05	0.09	0.03	0.15
Glu C2	0.11	0.11	0.24	0.07	0.02	0.13	0.05	0.01	0.11
Glu C3	0.22	0.09	0.31	0.16	0.05	0.32	0.20	0.04	0.32
Glu C4	0.19	0.01	0.30	0.29	0.03	0.38	0.27	0.01	0.43
Gly C2	0.08	0.15	1.31	0.23	0.19	0.77	0.10	0.15	0.64
Glycolate C1	3.89	22.13	9.07	3.08	23.62	4.53	2.66	23.38	4.69
Glycolate C2	0.00	24.25	0.00	0.00	25.24	0.00	0.00	26.58	0.00
GSH+GSSG	0.12	0.60	0.00	0.27	0.05	0.10	0.16	0.12	0.21
Gα C1	1.39	1.17	0.68	1.66	1.06	1.19	1.34	0.71	1.16
Gα C3	1.31	0.87	0.00	1.78	1.12	1.34	2.41	1.33	0.00
Gα C4	2.18	1.93	2.07	2.67	1.70	2.14	3.04	1.68	3.02
Gβ C3 + Gβ C5	0.91	1.11	0.49	1.03	0.81	0.80	0.58	0.69	0.96
Gβ C4	2.04	1.81	1.62	2.31	1.81	1.59	2.54	1.52	2.07
Mal C3	2.17	1.21	1.15	1.63	1.28	0.60	1.34	0.56	0.75
OAA C2	3.12	0.86	0.30	4.77	0.48	2.32	1.69	0.04	1.81
Ser C2	2.79	1.56	1.79	2.56	3.30	1.40	2.04	3.43	1.70
Ser C3	4	2.15	1.42	3.93	3.99	2.50	2.73	3.77	2.47
Ser-Gly C1	3.80	1.75	2.47	3.69	3.44	2.69	3.21	3.27	2.49
SF C1	2.66	2.28	2.35	4.17	2.93	3.04	5.50	3.32	4.78
SF C2	2.66	1.47	2.45	3.87	1.93	2.81	5.69	2.43	4.78
SF C3	3.80	1.61	1.56	5.99	1.58	3.46	4.85	1.89	4.40
SF C4 + Gβ C2	5.35	3.56	3.42	7.84	3.54	5.28	8.61	4.04	7.36
SF C5	2.55	1.48	2.22	4.00	1.93	3.03	5.46	2.46	4.90
SF C6	3.17	1.60	2.83	4.66	2.99	3.12	6.53	3.44	5.23
SG C6	2.43	1.43	1.82	3.34	1.17	2.09	3.72	1.83	3.16
SG4 + F5	2.32	1.63	2.23	2.97	1.55	2.35	3.86	1.77	3.12
SGα C1 + Gβ C1	1.34	1.54	0.68	1.59	1.34	1.05	1.46	0.97	1.19
Val C5	0.39	0.23	0.70	0.32	0.23	0.49	0.33	0.30	0.52

For calculations of % molar  $^{13}\text{C}$  allocation, see Materials and methods.

Abbreviations: Asn, asparagine; Asp aspartate; F, Fructose; F6P, Fructose-6-Phosphate; Fum, Fumarate; Gln, Glutamine; Glu, Glutamate; G, Glucose; GSH+GSSG, Glutathione; Mal, Malate; OAA, Oxaloacetate; Ser, serine; Gly, glycine; SF, Fructose position in sucrose; SG glucose position in sucrose; Val, Valine.

**Table S5.** Relative metabolite levels of rosette leaves of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants before (T0) and after transfer to air for 1 (T1) and 5 (T5) days.

	Before transfer (T0)			After 1 day in air (T1)			After 5 days in air (T5)		
	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>	Col-0	<i>amiRgox1/2</i>	<i>compl</i>
<b>Amino acids</b>									
Alpha-Alanine	1.00 ± 0.30	1.00 ± 0.10	0.89 ± 0.03	0.58 ± 0.07	0.52 ± 0.12	0.82 ± 0.18	0.27 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.45	0.69 ± 0.27
Arginine	1.00 ± 0.21	0.57 ± 0.42	0.86 ± 0.08	1.07 ± 0.06	1.47 ± 0.69	0.77 ± 0.19	0.79 ± 0.08	<b>10.16 ± 4.84<sup>a</sup></b>	0.61 ± 0.17
Asparagine	1.00 ± 0.16	0.62 ± 0.27	0.78 ± 0.21	0.73 ± 0.07	1.15 ± 0.12	0.47 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.17 <sup>a</sup>	<b>6.84 ± 1.85<sup>a</sup></b>	0.60 ± 0.07 <sup>a</sup>
Aspartic acid	1.00 ± 0.32	0.62 ± 0.25	0.64 ± 0.15	0.66 ± 0.21	<b>0.15 ± 0.04<sup>a</sup></b>	0.49 ± 0.13	0.39 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>a</sup>
Beta-Alanine	1.00 ± 0.27	1.10 ± 0.13	0.93 ± 0.12	1.04 ± 0.01	<b>2.29 ± 0.26<sup>a</sup></b>	1.08 ± 0.11	0.68 ± 0.2	2.94 ± 1.11 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.35
Cysteine	1.00 ± 0.13	0.86 ± 0.08	0.92 ± 0.17	1.00 ± 0.05	<b>3.38 ± 0.68<sup>a</sup></b>	0.89 ± 0.25	0.76 ± 0.16	<b>9.15 ± 4.25<sup>a</sup></b>	1.00 ± 0.08
GABA	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.28	0.70 ± 0.24	2.24 ± 1.38	1.60 ± 0.31	0.69 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.83 ± 1.84	5.53 ± 0.97 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.35
Glutamic acid	1.00 ± 0.34	0.64 ± 0.23	0.73 ± 0.08	0.81 ± 0.15	<b>0.23 ± 0.02<sup>a</sup></b>	0.58 ± 0.13	0.60 ± 0.22	0.87 ± 0.10	0.67 ± 0.08
Glutamine	1.00 ± 0.02	0.66 ± 0.48	0.65 ± 0.35	0.85 ± 0.26	<b>3.08 ± 0.64<sup>a</sup></b>	0.76 ± 0.22	0.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	<b>3.68 ± 1.21<sup>a</sup></b>	0.44 ± 1.11 <sup>a</sup>
Glycine	1.00 ± 0.06	1.07 ± 0.09	0.98 ± 0.16	5.23 ± 1.42	3.36 ± 0.59 <sup>a</sup>	4.38 ± 1.31 <sup>a</sup>	1.75 ± 0.46	<b>3.78 ± 0.82<sup>a</sup></b>	2.05 ± 0.36 <sup>a</sup>
Isoleucine	1.00 ± 0.06	0.87 ± 0.16	0.99 ± 0.15	1.19 ± 0.10	3.03 ± 0.84 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.13	1.19 ± 0.20	<b>4.55 ± 1.09<sup>a</sup></b>	1.31 ± 0.15 <sup>a</sup>
Leucine	1.00 ± 0.15	0.90 ± 0.13	0.97 ± 0.08	1.42 ± 0.21	<b>5.07 ± 1.59<sup>a</sup></b>	1.31 ± 0.07	1.55 ± 0.24 <sup>a</sup>	<b>3.56 ± 0.67<sup>a</sup></b>	1.55 ± 0.28
Lysine	1.00 ± 0.03	0.74 ± 0.24	0.98 ± 0.12	1.10 ± 0.10	<b>2.71 ± 0.49<sup>a</sup></b>	0.97 ± 0.12	1.37 ± 0.22	<b>6.23 ± 0.79<sup>a</sup></b>	1.19 ± 0.03
Methionine	1.00 ± 0.07	0.96 ± 0.22	0.92 ± 0.14	1.23 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.41 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.12 <sup>a</sup>	<b>2.91 ± 0.95<sup>a</sup></b>	0.91 ± 0.31
O-acetylserine	1.00 ± 0.24	0.81 ± 0.12	0.81 ± 0.08	0.87 ± 0.08	<b>1.24 ± 0.09<sup>a</sup></b>	0.77 ± 0.18	0.90 ± 0.11	<b>1.93 ± 0.46<sup>a</sup></b>	0.79 ± 0.10
Phenylalanine	1.00 ± 0.01	0.89 ± 0.17	0.96 ± 0.07	1.13 ± 0.02 <sup>a</sup>	<b>3.46 ± 0.71<sup>a</sup></b>	0.99 ± 0.07	0.93 ± 0.19	<b>7.73 ± 2.00<sup>a</sup></b>	1.17 ± 0.24
Proline	1.00 ± 0.55	1.20 ± 0.28	1.23 ± 0.59	1.19 ± 0.02	0.82 ± 0.20	1.08 ± 0.23	0.44 ± 0.23	1.53 ± 1.09	0.69 ± 0.13
Serine	1.00 ± 0.08	0.89 ± 0.19	0.75 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.09	1.03 ± 0.21	0.59 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.28	<b>2.21 ± 0.41<sup>a</sup></b>	0.79 ± 0.13
Threonine	1.00 ± 0.23	0.93 ± 0.14	0.86 ± 0.07	1.64 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.23	0.77 ± 0.26	<b>2.29 ± 0.52<sup>a</sup></b>	1.06 ± 0.18
Tryptophan	1.00 ± 0.21	0.56 ± 0.22	0.70 ± 0.18	0.58 ± 0.01 <sup>a</sup>	<b>3.12 ± 1.42<sup>a</sup></b>	0.51 ± 0.13	0.79 ± 0.25	<b>10.65 ± 4.95<sup>a</sup></b>	1.04 ± 0.06
Valine	1.00 ± 0.07	0.90 ± 0.13	0.95 ± 0.07	0.98 ± 0.03	<b>1.91 ± 0.38<sup>a</sup></b>	1.04 ± 0.09	0.83 ± 0.16	<b>3.07 ± 0.47<sup>a</sup></b>	1.04 ± 0.10
<b>Organic acids</b>									
2-Hydroxyglutaric acid	1.00 ± 0.21	0.80 ± 0.24	0.85 ± 0.24	0.83 ± 0.27	0.77 ± 0.19	0.64 ± 0.19	0.84 ± 0.36	<b>3.66 ± 0.88<sup>a</sup></b>	0.84 ± 0.32
Citramalic acid	1.00 ± 0.16	0.81 ± 0.29	0.78 ± 0.17	0.85 ± 0.09	0.93 ± 0.16	0.72 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.11	<b>1.64 ± 0.14<sup>a</sup></b>	0.99 ± 0.16
Citric acid	1.00 ± 0.49	0.46 ± 0.21	0.56 ± 0.14	0.66 ± 0.36	0.45 ± 0.06	0.37 ± 0.11	0.73 ± 0.18	0.66 ± 0.27	0.71 ± 0.24
Fumaric acid	1.00 ± 0.31	0.88 ± 0.18	0.96 ± 0.19	0.89 ± 0.27	0.85 ± 0.04	0.89 ± 0.06	0.97 ± 0.23	1.12 ± 0.07	1.22 ± 0.18
Glyceric acid	1.00 ± 0.06	1.17 ± 0.13	1.31 ± 0.07	2.80 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.68 ± 0.70 <sup>a</sup>	3.35 ± 0.17 <sup>a</sup>	4.14 ± 1.00 <sup>a</sup>	<b>12.96 ± 4.97<sup>a</sup></b>	4.63 ± 0.21 <sup>a</sup>
Glycolic acid	1.00 ± 0.12	1.29 ± 0.28	0.82 ± 0.15	1.08 ± 0.03	<b>729.64 ± 71.59<sup>a</sup></b>	1.59 ± 0.18 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.04	<b>478.13 ± 80.74<sup>a</sup></b>	1.40 ± 0.07 <sup>a</sup>
Malic acid	1.00 ± 0.38	0.60 ± 0.24	0.60 ± 0.25	0.71 ± 0.24	0.60 ± 0.13	0.37 ± 0.11	0.77 ± 0.25	<b>1.48 ± 0.33</b>	0.75 ± 0.31
Pipecolic acid	1.00 ± 0.27	0.99 ± 0.11	0.81 ± 0.04	1.06 ± 0.47	1.28 ± 0.21	0.74 ± 0.11	0.48 ± 0.11	1.58 ± 0.50	0.85 ± 0.21
Pyruvic acid	1.00 ± 0.49	0.98 ± 0.10	0.91 ± 0.24	1.21 ± 0.25	1.05 ± 0.30	1.74 ± 0.21	0.66 ± 0.21	0.95 ± 0.40	1.24 ± 0.50
Succinic acid	1.00 ± 0.28	0.85 ± 0.18	1.02 ± 0.35	1.19 ± 0.34	1.74 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.13	0.91 ± 0.22	<b>3.16 ± 0.35<sup>a</sup></b>	1.35 ± 0.46
<b>Sugars</b>									
Arabinose	1.00 ± 0.13	0.93 ± 0.08	0.90 ± 0.07	0.72 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.15	1.30 ± 0.21	0.96 ± 0.13
Fructose	1.00 ± 0.31	0.83 ± 0.05	0.99 ± 0.13	0.40 ± 0.04	<b>1.40 ± 0.40<sup>a</sup></b>	0.37 ± 0.22	1.26 ± 0.11	1.14 ± 0.22	1.12 ± 0.40
Galactosylglycerol	1.00 ± 0.79	1.04 ± 0.05	1.19 ± 0.30	1.04 ± 0.33	1.41 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.84 ± 0.12	2.06 ± 1.43	1.50 ± 0.37	1.24 ± 0.12
Glucopyranose	1.00 ± 0.62	1.32 ± 0.15	1.48 ± 0.54	0.72 ± 0.26	<b>1.99 ± 0.11</b>	0.34 ± 0.16	0.13 ± 0.02	<b>1.32 ± 0.39</b>	0.16 ± 0.02
Glucose	1.00 ± 0.18	0.96 ± 0.04	1.04 ± 0.14	0.54 ± 0.08 <sup>a</sup>	<b>1.01 ± 0.09</b>	0.48 ± 0.20	0.96 ± 0.04	0.66 ± 0.14	0.92 ± 0.22
Raffinose	1.00 ± 0.48	0.62 ± 0.09	0.98 ± 0.13	0.33 ± 0.07	<b>0.10 ± 0.03<sup>a</sup></b>	0.28 ± 0.06	0.93 ± 0.24	0.16 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.46
Rhamnose	1.00 ± 0.18	1.26 ± 0.15	1.36 ± 0.32	1.35 ± 0.19	1.86 ± 0.28 <sup>a</sup>	1.33 ± 0.14	1.59 ± 0.30	2.32 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.27
Ribose	1.00 ± 0.04	0.99 ± 0.05	0.94 ± 0.03	1.24 ± 0.22	1.54 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.13	1.84 ± 1.02	2.81 ± 0.54 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.18
Sucrose	1.00 ± 0.24	0.82 ± 0.17	0.99 ± 0.22	0.85 ± 0.04	1.03 ± 0.16	0.84 ± 0.01	1.01 ± 0.32	0.90 ± 0.07	1.20 ± 0.04
Xylose	1.00 ± 0.23	0.76 ± 0.08	0.85 ± 0.07	0.65 ± 0.06	<b>0.83 ± 0.06</b>	0.62 ± 0.05	1.02 ± 0.12	1.10 ± 0.35	0.93 ± 0.25
<b>Miscellaneous</b>									
Ascorbic acid	1.00 ± 0.19	1.02 ± 0.08	1.10 ± 0.09	1.09 ± 0.25	1.20 ± 0.24	1.21 ± 0.20	1.15 ± 0.19	0.56 ± 0.43	0.83 ± 0.74
Beta-sitosterol	1.00 ± 0.15	1.10 ± 0.12	1.08 ± 0.25	1.09 ± 0.28	1.30 ± 0.14	0.89 ± 0.28	0.89 ± 0.24	1.11 ± 0.64	0.97 ± 0.26
Campesterol	1.00 ± 0.36	0.92 ± 0.07	0.93 ± 0.39	0.98 ± 0.17	1.22 ± 0.33	0.95 ± 0.38	0.71 ± 0.11	1.36 ± 0.29	1.11 ± 0.34
Digalactosylglycerol	1.00 ± 0.20	0.82 ± 0.07	0.96 ± 0.06	0.76 ± 0.08	0.78 ± 0.11	0.66 ± 0.06	0.97 ± 0.10	0.50 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.29
Erythritol	1.00 ± 0.11	1.14 ± 0.07	1.07 ± 0.21	1.23 ± 0.20	1.50 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.24 ± 0.36	0.83 ± 0.07	1.78 ± 0.27 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.42
Erythrono-1,4-lactone	1.00 ± 0.17	0.74 ± 0.06	0.91 ± 0.09	0.97 ± 0.26	0.82 ± 0.06	1.10 ± 0.06	0.91 ± 0.14	0.94 ± 0.10	1.22 ± 0.05
Ethanolamine	1.00 ± 0.05	1.05 ± 0.18	0.88 ± 0.17	1.16 ± 0.42	1.20 ± 0.22	0.81 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.79 ± 1.04	1.34 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.17
Galactinol	1.00 ± 0.34	0.68 ± 0.11	1.01 ± 0.12	0.56 ± 0.06	0.46 ± 0.04	0.62 ± 0.05	1.54 ± 0.39	0.40 ± 0.13	1.40 ± 0.61
Galactonic acid	1.00 ± 0.23	0.86 ± 0.14	0.99 ± 0.11	1.07 ± 0.16	1.02 ± 0.07	0.84 ± 0.15	1.27 ± 0.17	1.23 ± 0.15	1.31 ± 0.04
Lactic acid	1.00 ± 0.16	1.37 ± 0.48	1.12 ± 0.32	1.09 ± 0.45	1.45 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.35	0.74 ± 0.23	<b>3.01 ± 0.49<sup>a</sup></b>	0.78 ± 0.33
Levoglucosan	1.00 ± 0.09	1.02 ± 0.03	1.15 ± 0.21	1.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.47 ± 0.37	1.90 ± 0.41	0.88 ± 0.25	1.15 ± 0.42	1.48 ± 0.52
Mannitol	1.00 ± 0.09	0.89 ± 0.04	1.01 ± 0.16	0.92 ± 0.02	1.03 ± 0.21	0.88 ± 0.05	0.54 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.20	0.77 ± 0.12
Myo-inositol	1.00 ± 0.20	0.79 ± 0.13	0.93 ± 0.16	0.79 ± 0.09	0.74 ± 0.21	0.74 ± 0.08	0.97 ± 0.27	0.57 ± 0.15	0.95 ± 0.12
Nicotinic acid	1.00 ± 0.13	0.75 ± 0.17	0.71 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.22	1.08 ± 0.21	0.69 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.16	1.26 ± 0.35	0.79 ± 0.02
Palmitic acid	1.00 ± 0.14	1.34 ± 0.68	1.26 ± 0.48	1.20 ± 0.27	1.24 ± 0.07	1.01 ± 0.16	1.04 ± 0.16	1.35 ± 0.47	0.97 ± 0.17
Phosphoric acid	1.00 ± 0.46	0.69 ± 0.27	0.73 ± 0.13	0.95 ± 0.12	0.91 ± 0.12	0.66 ± 0.06	1.26 ± 0.18	1.45 ± 0.48	0.76 ± 0.19
Putrescine	1.00 ± 0.06	1.07 ± 0.18	1.22 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.90 ± 0.11	<b>4.26 ± 0.35<sup>a</sup></b>	1.17 ± 0.10	0.90 ± 0.16	<b>3.58 ± 1.17<sup>a</sup></b>	1.60 ± 0.31
Salicylic acid	1.00 ± 0.39	0.82 ± 0.13	0.81 ± 0.12	0.80 ± 0.10	<b>1.08 ± 0.09</b>	0.68 ± 0.08	0.71 ± 0.16	0.91 ± 0.21	0.95 ± 0.13
Shikimic acid	1.00 ± 0.06	0.93 ± 0.07	0.90 ± 0.04	1.60 ± 0.15 <sup>a</sup>	<b>0.91 ± 0.02</b>	1.60 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.73 ± 0.13 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.13	0.94 ± 0.16
Sinapinic acid	1.00 ± 0.22	0.76 ± 0.23	0.84 ± 0.13	0.91 ± 0.07	1.00 ± 0.06	0.75 ± 0.12	0.85 ± 0.13	1.25 ± 0.30	0.98 ± 0.10
Sorbitol	1.00 ± 0.30	0.79 ± 0.07	0.88 ± 0.24	0.83 ± 0.07	0.75 ± 0.06	0.73 ± 0.05	0.99 ± 0.21	1.27 ± 0.42	1.42 ± 0.51
Spermidine	1.00 ± 0.38	0.71 ± 0.48	0.74 ± 0.52	1.02 ± 0.63	1.93 ± 0.85	2.07 ± 0.63	0.41 ± 0.05	1.67 ± 0.64	0.77 ± 0.26
Threonic acid	1.00 ± 0.15	0.77 ± 0.10	0.89 ± 0.14	0.93 ± 0.18	0.93 ± 0.07	0.94 ± 0.14	0.88 ± 0.12	<b>1.63 ± 0.24<sup>a</sup></b>	1.07 ± 0.02
Urea	1.00 ± 0.08	1.22 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.19	0.87 ± 0.13	<b>1.19 ± 0.08</b>	0.83 ± 0.16	0.81 ± 0.17	<b>3.04 ± 1.09<sup>a</sup></b>	0.76 ± 0.14

Values are given for whole rosette leaves of Col-0, *amiRgox1/2* and *compl* plants with the corresponding Col-0 T0 content set to 1. Values that were significantly different in the *amiRgox1/2* line compared to the Col-0 and *compl* lines after 1 and/or 5 days in air are shown in bold, and <sup>a</sup> indicates significantly different values compared to Col-0 at T0 (Student's t-test, P<0.05).

# **Discussion générale**

## I. Rappel du contexte scientifique

Dans la littérature, le comportement de plusieurs voies du métabolisme primaire en réponse à une diminution de l'intensité photorespiratoire a déjà été décrit. Mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas toujours très explicites et/ou corrélés avec l'ensemble des données observées dans la littérature :

- La plupart des mutants photorespiratoires montrent une plus faible assimilation nette de CO<sub>2</sub> dans l'air. Cependant les mécanismes impliqués dans cette inhibition photosynthétique divergent : la photoinhibition (Takahashi *et al.*, 2007), l'accumulation d'intermédiaires photorespiratoires toxiques pour l'activité du cycle de Calvin-Benson (Anderson, 1971 ; Chastain et Ogren, 1989 ; Lu *et al.*, 2013), une diminution de l'état d'activation de la RuBisCO (Xu *et al.*, 2009), un défaut de production ou de recyclage du RuBP (Chastain et Ogren, 1989).
- L'activité du cycle de Krebs serait plus importante dans des fortes conditions photorespiratoires chez *Xanthium strumarium* (Tcherkez *et al.*, 2008) ou dans de faibles conditions photorespiratoires pour un mutant du complexe GDC chez *Solanum tuberosum* (Bykova *et al.*, 2005).
- L'absorption et l'assimilation de nitrates sont inhibées dans de faibles conditions photorespiratoires (700 µL.L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> dans l'air, ou dans de l'air à 2% O<sub>2</sub> par rapport à l'air) dans les feuilles d'*A. thaliana* dès 300 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (Rachmilevitch *et al.*, 2004).

Par le passé, le phénotype photorespiratoire présent dans l'air, mais absent en fort CO<sub>2</sub>, se révéla idéal pour identifier les gènes impliqués dans la photorespiration (voir les travaux de Somerville et Ogren, par exemple). Par la suite, l'utilisation de mutants photorespiratoires afin de comprendre les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire a permis de fournir beaucoup d'informations intéressantes, mais il était souvent difficile de les interpréter à cause de la complexité des interactions métaboliques (Timm *et al.*, 2012 ; Florian *et al.*, 2014a, b). Au cours de cette thèse, nous avons essayé d'apporter des éléments de réponse sur les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire à travers la caractérisation de mutants pour les enzymes GGT et GOX, mutants qui étaient encore peu ou pas caractérisés. Nous avons analysé ces mutants dans l'air et/ou après leur transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Dans la discussion qui va suivre, la comparaison des informations recueillies avec ces mutants va nous permettre de proposer un modèle pour expliquer certaines des



interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire dans les feuilles d'*Arabidopsis thaliana*.

## **II. L'inhibition de l'activité photosynthétique chez les mutants photorespiratoires dans l'air est principalement due au ralentissement du recyclage du carbone pour la régénération du RuBP par le cycle de Calvin-Benson**

Dans la littérature, quatre classes de phénotypes photorespiratoires sont décrites avec un degré de gravité plus ou moins grand (Timm et Bauwe, 2013). Les mutants *ggt1-1* et *ggt1-2* cultivés dans l'air présentent un retard de croissance marqué, tandis que lors d'un transfert de fort CO<sub>2</sub> à l'air, un très léger retard de croissance est observé après 2 semaines, suggérant un phénotype de classe III (la même classe que *hpr1* et *cat2*). Le mutant *amiRgox1/2* présente un retard de croissance très sévère dans l'air, tandis que lors d'un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, un retard de croissance est observé accompagné de symptômes de sénescence après 5 jours, suggérant un phénotype de classe II (la même classe que *glyk1*, *shm1*, *pglp1* et *dct1*). Parallèlement, suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, l'assimilation nette de CO<sub>2</sub> est rapidement inhibée à la lumière chez les mutants *amiRgox1/2* et *ggt1*. La rapide inhibition de la photosynthèse après transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air constitue l'un des traits majeurs et universels des mutants photorespiratoires, tout comme leurs phénotypes (retard de croissance, chlorose, et parfois de la létalité). L'hypothèse d'un mécanisme universel permettant d'expliquer l'inhibition de la photosynthèse et l'apparition des différents phénotypes photorespiratoires en lien avec la baisse de la photosynthèse chez l'ensemble de ces mutants peut se poser. Cependant, il est difficile de corréler le degré d'inhibition de la photosynthèse et l'apparition du phénotype photorespiratoire chez ces mutants d'après des données disponibles dans la littérature :

- Les mutants *glyk1* et *shm1* montrent le même degré d'inhibition de l'assimilation de CO<sub>2</sub> par rapport au contrôle après 5 jours de transfert de fort CO<sub>2</sub> en l'air, alors que le mutant *glyk1* présente des symptômes de chlorose et un retard de croissance plus fort que le mutant *shm1* (Timm *et al.*, 2012).
- L'inhibition de la photosynthèse par rapport au contrôle chez le mutant *glyk1* après 30 min de transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air est d'environ 28 % par rapport au contrôle (Takahashi *et al.*, 2007) contre 55% pour le mutant *amiRgox1/2* (Dellero *et al.*,

**Tableau 4.** Comparaison de la photosynthèse, l'ETR et le NPQ entre différents mutants photorespiratoires.

<b>Mutant</b>	<b>% d'inhibition de la photosynthèse</b>	<b>% d'inhibition de l'ETR</b>	<b>% d'augmentation du NPQ</b>
<i>ggt1-1</i>	36,4	32	241
<i>ggt1-2</i>	39,4	36,3	233
<i>amiRgox1/2</i>	54,5	52	258
<i>fd-gogat</i>	60	-	450
<i>shm1</i>	63	-	340
<i>dit2</i>	76	-	600

Les pourcentages sont relatifs aux contrôles pour chaque expérience. Les valeurs observées correspondent à 30 min de lumière après transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air pour les mutants *fd-gogat*, *shm1* et *dit2*, 90 min pour les mutants *amiRgox1/2* et une nuit à l'obscurité + 90 min de lumière pour les mutants *ggt1* (sources : Takahashi *et al.*, 2007 ; Deller *et al.*, 2015 b ; Deller *et al.*, soumis).

soumis). Or, ces mutants présentent des symptômes relativement similaires après 5 jours de transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air (Timm *et al.*, 2012 ; Deller *et al.*, soumis).

Pour pouvoir comparer convenablement les mutants, il serait nécessaire de connaître l'intensité du flux photorespiratoire chez tous les mutants photorespiratoires, afin de déterminer s'il y a une corrélation entre le degré de réduction du flux, et l'apparition du phénotype. Pour autant, la sévérité du phénotype photorespiratoire peut varier d'un mutant à un autre pour diverses raisons connues :

- Le phénotype des mutants *gldp1-1xgldp2-2* et *shmt1-1xshmt2-2* dans l'air serait essentiellement dû à la forte altération de l'activité du métabolisme C<sub>1</sub> (Engel *et al.*, 2007).
- Les mutants *gox1*, *gox2*, *gldp1-1* et *gldp2-2* ne montrent pas de phénotype photorespiratoire dans l'air, et les mutants *hpr1* et *ggt1* montrent un faible phénotype photorespiratoire, notamment à cause de la redondance fonctionnelle entre des gènes codant la GOX (ce travail de thèse), la protéine P de la GDC (Engel *et al.*, 2007), la HPR (Timm *et al.*, 2011), et la redondance fonctionnelle entre les activités des aminotransférases de plantes (Liepman et Olsen, 2003 ; Zhang *et al.*, 2015).

Bien que le degré d'inhibition de la photosynthèse soit difficilement corrélable avec l'apparition du phénotype photorespiratoire, il peut être corrélé avec des paramètres de fluorescence des PSII. Lors d'un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, le NPQ des feuilles des mutants pour les enzymes GOX (*amiRgox1/2*), GGT, Fd-GOGAT, SHMT et le transporteur DiT2 augmente fortement par rapport au contrôle (Tableau 4). Pour tous ces mutants, cette augmentation est corrélée positivement avec l'inhibition de la photosynthèse, mais aussi avec la diminution du taux de transfert d'électrons photosynthétique (ETR) pour les mutants *ggt* et *amiRgox1/2*. Chez les mutants *ggt* et *amiRgox1/2*, la rapide réversion du ratio  $F_v'/F_m'$  à l'obscurité démontre que l'augmentation du NPQ n'était pas due à un changement de transition d'état 1 vers l'état 2, ni même à la photoinhibition, proposant donc que la majorité du NPQ a pour origine de la dissipation de l'énergie reçue par le PSII par chaleur. Ce phénomène d'augmentation du NPQ est observable chez la lignée contrôle, mais il est transitoire ; dès que la lumière est perçue par les feuilles, le NPQ augmente (1,5 unités) mais il diminue rapidement après 10 minutes à la lumière. Ces 10 minutes correspondent au temps nécessaire pour que les enzymes du cycle de Calvin-Benson soient activées par des

Thioredoxines (elles-mêmes réduites et rendues « actives » *via* la ferredoxine<sub>réduite</sub> produite par le transfert d'électrons photosynthétique). Cette activation permet de consommer l'ATP et le NADPH par le cycle de Calvin-Benson, et donc de maintenir le transfert d'électrons et d'utiliser le gradient de protons transthylakoïdien pour la production d'ATP par l'ATPase. Donc au cours de cette activation, l'accumulation transitoire du gradient de proton inhibe le transfert d'électrons chloroplastiques, aboutissant à une dissipation de l'énergie reçue par les antennes photosynthétiques associées au PSII sous forme de chaleur (voir Kanazawa et Kramer, 2002 ; Finazzi *et al.*, 2004). Dans le cas des mutants photorespiratoires, le fait que l'augmentation du NPQ perdure dans le temps, associée à une plus faible activité photosynthétique, suggère que c'est la réduction de l'activité du cycle de Calvin-Benson chez ces mutants qui provoque ces symptômes. Ainsi, la baisse de l'activité photorespiratoire inhibe l'activité photosynthétique, *via* l'inhibition de l'activité du cycle de Calvin-Benson.

Si le NPQ reste élevé à cause d'une plus faible activité du cycle de Calvin-Benson, une augmentation de la quantité de NADPH et d'ATP pourrait être envisagée chez ces mutants. Cependant, celle-ci pourrait être seulement transitoire car :

- La diminution de la fixation de CO<sub>2</sub> est corrélée à la baisse de l'ETR, c'est-à-dire que le ratio entre la production et la consommation de NADPH reste inchangé. Donc, au bout de 4 h de lumière, le ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> pourrait rester stable.
- La continuité du gradient de protons transthylakoidien non-dissipé devrait diminuer la synthèse d'ATP et le ratio ATP/ADP.

Ceci a été observé chez les mutants *ggt1* après 4 heures de transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air.

Plusieurs mécanismes/causes permettant d'expliquer l'inhibition de l'activité du cycle de Calvin-Benson chez les mutants photorespiratoires par rapport au contrôle ont déjà été proposés:

- L'accumulation de glyoxylate qui va diminuer l'état d'activation de la RuBisCO et/ou son activité carboxylase (Mulligan *et al.*, 1983 ; Cook *et al.*, 1985 ; Chastain et Ogren, 1989 ; Campbell et Ogren, 1990 ; Lu *et al.*, 2013).
- L'accumulation de 2-PG qui va inhiber l'activité de la triose phosphate isomérase, enzyme impliquée dans le recyclage du RuBP (Anderson, 1971).
- L'interruption du recyclage du carbone par la photorespiration qui va ralentir le recyclage du RuBP (Chastain et Ogren, 1989).

Une concentration en glyoxylate supérieure à 500  $\mu\text{M}$  est suffisante pour commencer à diminuer l'état d'activation de la RuBisCO *in vitro* (Chastain et Ogren, 1989). De plus, l'incubation des chloroplastes d'épinard avec 300  $\mu\text{M}$  de glyoxylate diminue par 3 la fixation de  $\text{CO}_2$  par la RuBisCO en moins de 10 minutes (Chastain et Ogren, 1989). Chez le riz, des lignées antisens pour le gène *OsGLO4* (codant une GOX foliaire) accumulent du glyoxylate dans les feuilles, et présentent une inhibition de l'activité photosynthétique et de l'état d'activation de la RuBisCO (Lu *et al.*, 2013), bien que l'accumulation de glyoxylate chez un mutant GOX soit difficile à expliquer.

Pour autant, l'accumulation de ce composé seule ne suffit pas à expliquer l'inhibition de la photosynthèse chez tous les mutants photorespiratoires :

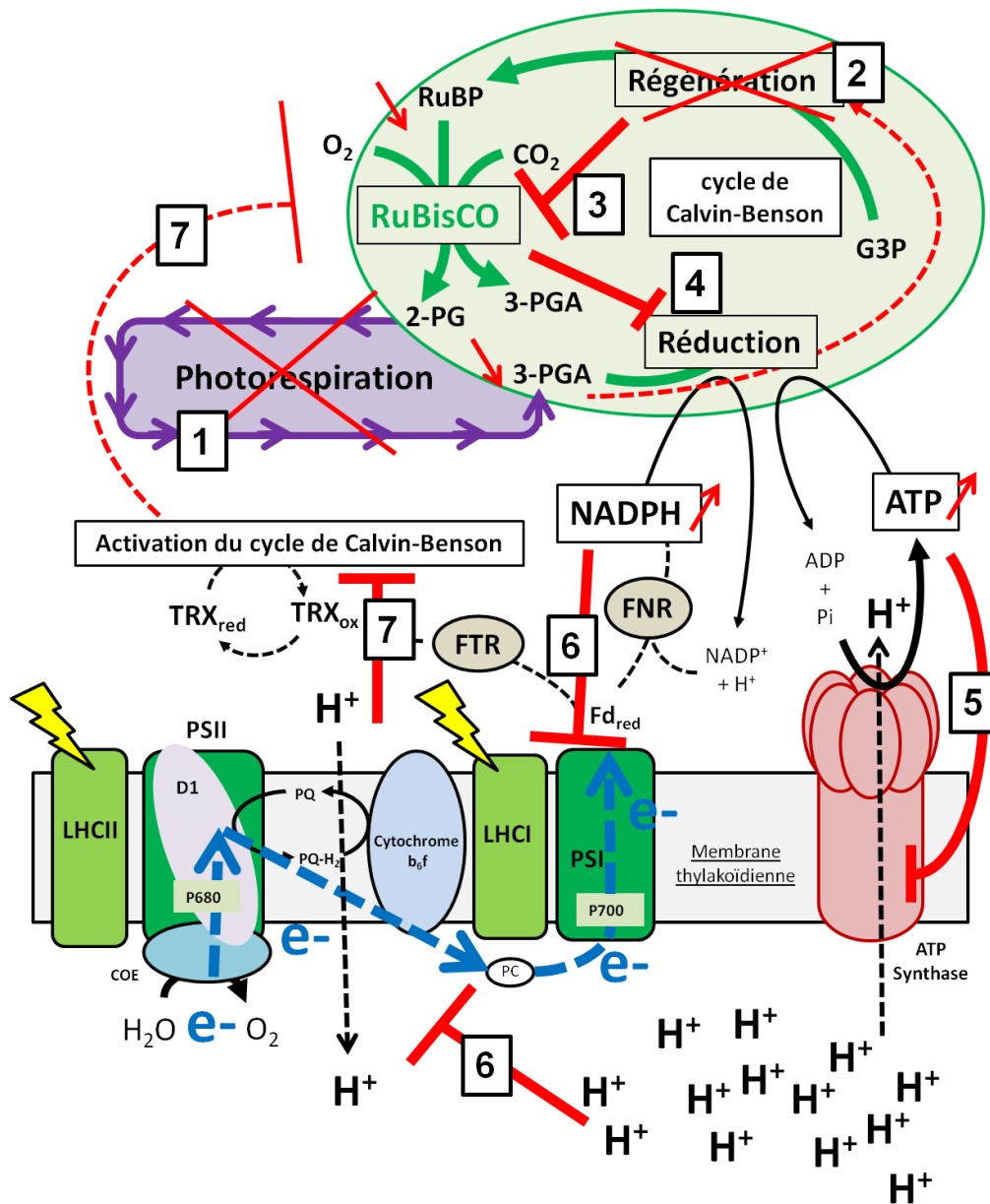
- Le mutant *amiRgox1/2* accumule d'énormes quantités de glycolate, mais pas de glyoxylate, alors que sa photosynthèse est réduite dans l'air (Dellero *et al.*, soumis).
- Chez le riz, d'autres lignées antisens pour la GOX qui accumulent beaucoup de glycolate (1000 fois plus pour 10% d'activité GOX restante) mais pas de glyoxylate, montrent une inhibition de l'état d'activation de la RuBisCO dans l'air, mais pas en fort  $\text{CO}_2$  (Xu *et al.*, 2009).
- Les mutants *ggt1* accumulent 10 fois plus de glyoxylate par rapport au contrôle après une nuit et 4 h de lumière lors d'un transfert de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air. Néanmoins, les activités RuBisCO mesurées *in vitro*, ainsi que l'état d'activation de la RuBisCO sont identiques chez ces mutants et le contrôle. Ceci implique que l'accumulation de glyoxylate dans ces plantes n'affecte pas les propriétés catalytiques de la RuBisCO. Cependant, il est possible que lors des mesures d'activités *in vitro*, la dilution de l'extrait foliaire dans le milieu réactionnel final puisse diminuer l'effet inhibiteur du glyoxylate sur l'activité de la RuBisCO.
- Chez *Solanum tuberosum*, des lignées surexprimant les trois sous-unités de l'enzyme glycolate déshydrogénase d'*E. coli* avec un adressage chloroplastique montrent une plus grande croissance et 25% de photosynthèse en plus par rapport au contrôle. Or ces lignées accumulent 2 à 3 fois plus de glyoxylate que le contrôle (Nölke *et al.*, 2014).

Ainsi, bien que le glyoxylate puisse avoir un effet nocif sur les propriétés catalytiques de la RuBisCO de certaines espèces *in vitro*, aucune donnée ne permet d'affirmer que c'est l'accumulation du glyoxylate chez tous les mutants photorespiratoires qui va conduire à la baisse de leurs activités photosynthétiques. De plus, aucun mécanisme de transport du glyoxylate du peroxysome vers le chloroplaste n'a été identifié à ce jour.

Le 2-PG peut inhiber *in vitro* la triose phosphate isomérase purifiée à partir de feuilles chez *P. sativum*, avec un  $K_i = 15,2 \mu\text{M}$ . Or, cette enzyme joue un rôle clé pour la régénération du RuBP par le cycle de Calvin-Benson, et donc son accumulation dans les chloroplastes des mutants photorespiratoires pourrait ralentir l'activité de ce cycle. A l'heure actuelle, il n'y a pas de donnée dans la littérature montrant une accumulation de 2-PG dans les mutants photorespiratoires, car il n'a jamais été mesuré. Il faudrait donc mesurer ce composé chez les mutants photorespiratoires pour ensuite le corrélérer avec les changements d'activité photosynthétique observés.

En attendant, d'autres hypothèses sont à considérer dans le cadre d'un mécanisme d'inhibition de la photosynthèse s'appliquant à tous les mutants photorespiratoires, comme l'interruption du recyclage du carbone photorespiratoire, par exemple. En effet, la molécule de 3-PGA produite par la photorespiration à partir de 2 molécules de 2-PG peut servir à la régénération du RuBP. Chez le mutant *shm1* d'*A. thaliana*, la quantité de RuBP dans les feuilles est 30% plus faible que chez le contrôle après seulement 5 minutes de lumière sous fortes conditions photorespiratoires (air à 50%  $\text{O}_2$ ) (Chastain et Ogren, 1989). Comme ces changements ne sont pas observés dans des conditions faiblement photorespiratoires (air à 2%  $\text{O}_2$ ), ils démontrent que la photorespiration participe activement à la régénération du RuBP dans l'air, *via* le recyclage du carbone du 2-PG. De plus, le non-recyclage du 2-PG par la photorespiration représente une perte considérable de carbone pour la plante. En effet, chez le mutant *amiRgox1/2* avec 5-10% d'activité GOX restante dans les feuilles, 50% du carbone fraîchement assimilé par la plante se trouve bloqué dans le glycolate.

Récemment, des plantes surexprimant les sous-unités H ou L du complexe GDC ont montré une meilleure croissance foliaire par rapport au contrôle, associée à une plus forte activité photosynthétique et photorespiratoire (Timm *et al.*, 2013b ; Timm *et al.*, 2015). De plus, la quantité de certains intermédiaires du cycle de Calvin-Benson était réduite chez les plantes surexprimant la sous-unité L, suggérant donc une plus forte activité de ce cycle (Timm *et al.*, 2013). Comme la quantité de certains métabolites associés à la photorespiration était réduite aussi dans ces lignées (le glycolate, la glycine et le glycérate), il a été proposé que l'augmentation de l'activité GDC (étape « limitante » du cycle photorespiratoire d'après Bauwe et Kolukisaoglu, 2003) chez ces lignées diminuait la quantité d'intermédiaires du cycle photorespiratoire pouvant inhiber l'activité du cycle de Calvin-Benson (le glyoxylate et le 2-PG), aboutissant donc à une augmentation de l'activité du cycle de Calvin-Benson (Timm



**Figure 14.** Modèle d'un mécanisme commun de la mise en place de l'inhibition de la photosynthèse chez les mutants photorespiratoires.

1. Limitation de l'activité du cycle photorespiratoire
2. Inhibition du recyclage du RuBP
3. Limitation de l'activité de la RuBisCO par la quantité de RuBP
4. Diminution de la consommation de NADPH et ATP par le cycle de Calvin-Benson
5. Inhibition de la synthèse d'ATP
6. Inhibition du transfert d'électrons par la non-dissipation du gradient de protons et l'accumulation de NADPH
7. Inhibition de l'activation d'enzymes du cycle de Calvin-Benson par la réduction du transfert d'électrons



*et al.*, 2015). Cependant, ces résultats peuvent aussi être interprétés en faveur d'un recyclage plus rapide du carbone par l'augmentation de l'activité GDC, si elle est une étape limitante du cycle. Ceci augmenterait alors la vitesse de régénération du RuBP. Chez le riz, une lignée surexprimant le gène homologue à *SHMT1* montre une meilleure efficacité photosynthétique que le contrôle, ainsi qu'un rendement en graines plus élevé (Wu *et al.*, 2015). Cela implique que c'est l'activité du complexe GDC couplée à celle de la SHMT qui ensemble, sont limitantes pour l'activité photosynthétique, et possiblement la vitesse de recyclage du carbone par la photorespiration.

Pour conclure, l'inhibition de l'activité photosynthétique chez les mutants photorespiratoires suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air est due à la réduction de l'activité de la RuBisCO. Ce ralentissement peut être multifactoriel (inhibition de l'activité de la RuBisCO, de son état d'activation, ralentissement de la régénération du RuBP). Cependant, un mécanisme majeur, affectant l'ensemble des mutants photorespiratoires, ayant un lien avec le recyclage du carbone du 2-PG en 3-PGA se dégage : c'est le ralentissement du recyclage du carbone par la photorespiration qui va réduire la vitesse de régénération du RuBP, et limiter ainsi la fixation de CO<sub>2</sub> par la RuBisCO (Figure 14). Cette plus faible activité va limiter la consommation d'ATP et de NADPH. Ceci maintiendra un gradient de protons transthylakoidien élevé, qui ralentira le transfert d'électrons photosynthétique, et aboutira à la dissipation de l'excès d'énergie absorbée par les antennes de PSII sous forme de chaleur (augmentation du NPQ).

### **Perspectives à court terme:**

Afin de vérifier que l'inhibition de l'activité photosynthétique chez les mutants photorespiratoires est essentiellement due à un défaut de régénération du RuBP, les quantités de RuBP et d'intermédiaires du cycle de Calvin-Benson devraient être mesurées, par exemple dans les plantes contrôles et la plante mutante *amiRgox1/2* après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Luo *et al.* (2007) ont montré que plusieurs composés phosphorylés appartenant au cycle de Calvin-Benson peuvent être séparés et quantifiés de façon fiable (un seul isomère par pic élué). Leur méthode de chromatographie par paire d'ions en phase inverse couplée à un spectromètre de masse triple quadrupole (IPC-MS/MS) avec une phase mobile d'alkylamine tributylamine a été confirmée par Arrivault *et al.* (2009), et permet de doser les composés suivants : le RuBP, le G3P, le DHAP, le F1,6bP, le F6P, le S1,7bP, le S7P et le R5P.

De même, l'hypothèse de l'accumulation de 2-PG pouvant potentiellement inhiber l'activité du cycle de Calvin-Benson pourrait être testée en dosant le 2-PG chez le mutant *amiRgox1/2*

après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Le 2-PG a déjà pu être mesuré dans différents tissus de souris à des concentrations entre 4 à 17 nmol/g tissus frais, par une méthode de chromatographie ionique couplée à un spectromètre de masse à spray électronégatif (Knight *et al.*, 2011).

### **III. L'inhibition de la photorespiration chez les mutants photorespiratoires dans l'air diminue la quantité de RuBisCO foliaire à cause de l'inhibition de la photosynthèse**

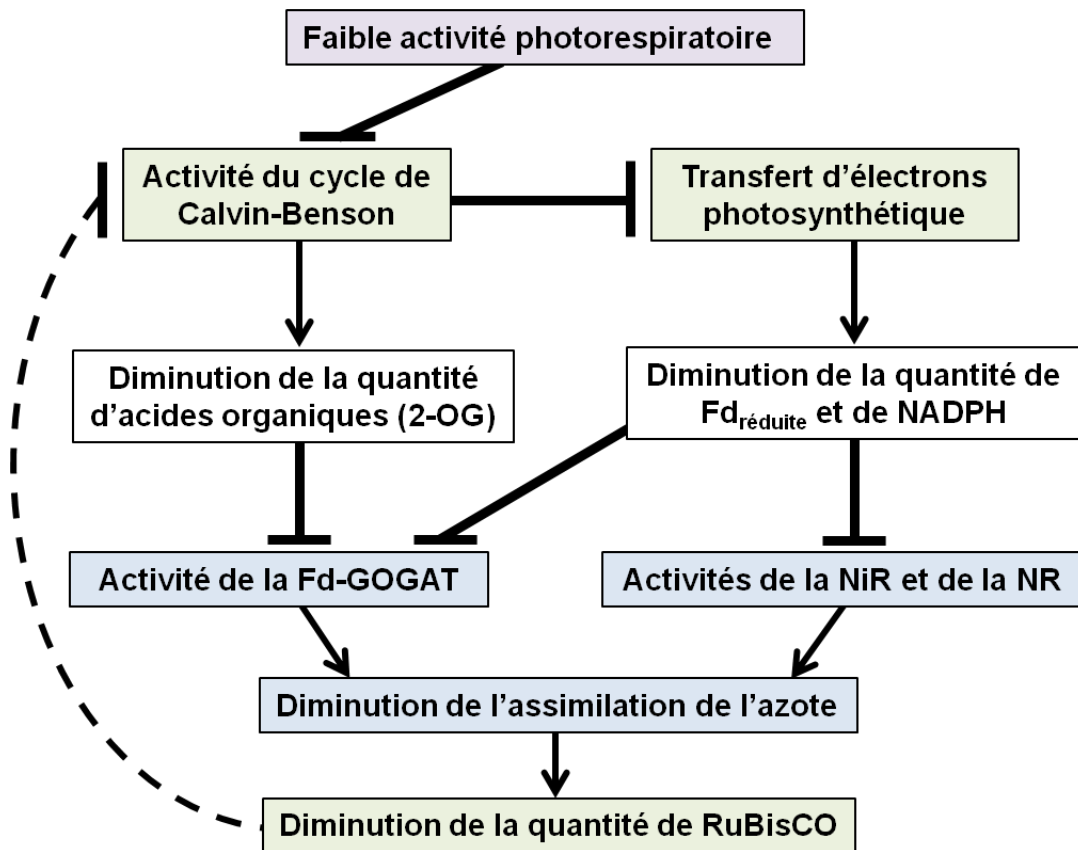
Suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, la quantité de RuBisCO par surface chez les plantes contrôles augmentait d'environ 150% après 5 à 6 jours. Or ces plantes assimilent seulement 30% de CO<sub>2</sub> en moins juste après un transfert dans l'air comparé à la condition en fort CO<sub>2</sub>. L'augmentation de la quantité de RuBisCO chez ces plantes pourrait être vue comme un moyen d'accroître la fixation de CO<sub>2</sub> dans l'air, afin qu'elle devienne semblable à la condition en fort CO<sub>2</sub>. Cependant, lors des expériences de marquage au <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, l'activité photosynthétique chez les plantes contrôles était identique une fois ces plantes transférées dans l'air (transfert direct, après 1 jour et 5 jours dans l'air) (données non publiées). Ainsi, l'augmentation de la quantité de RuBisCO dans les feuilles ne serait pas nécessairement liée à un besoin de compenser la baisse de l'activité carboxylase de la RuBisCO une fois dans l'air. La RuBisCO représente environ 50% des protéines foliaires, et un quart de l'azote foliaire, c'est donc un réservoir majeur d'azote chez les plantes (Parry *et al.*, 2008). Or la réduction de l'absorption et de l'assimilation des nitrates dans des faibles conditions photorespiratoires (fort CO<sub>2</sub>) a déjà été observée chez l'orge et *A. thaliana* (Bloom *et al.*, 2010). L'augmentation de la quantité de RuBisCO observée chez la lignée contrôle après transfert pourrait donc être liée à une augmentation de l'absorption et de l'assimilation des nitrates dans les feuilles. Cependant, les plantes contrôles cultivées en fort CO<sub>2</sub> montrent une meilleure croissance que les plantes cultivées dans l'air d'après la comparaison de leurs phénotypes (Dellero *et al.*, 2015b), donc l'assimilation d'azote ne serait pas limitante en fort CO<sub>2</sub> pour la croissance des plantes. Plusieurs hypothèses ont été proposées par Bloom pour expliquer la réduction de l'assimilation des nitrates en fort CO<sub>2</sub> : l'inhibition du transport des nitrites, la faible disponibilité en Fd<sub>réduite</sub> pour l'activité de la NiR et la faible stimulation de l'export du pouvoir réducteur chloroplastique vers le cytosol pour former du NADH pour l'activité de la NR

(cf introduction et Bloom, 2015). Suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, la quantité de RuBisCO par surface de feuilles chez les mutants *ggt1* stagnait après 6 jours de transfert par rapport aux plantes contrôles. Par analogie avec les plantes contrôles, une réduction de l'assimilation des nitrates dans ces lignées *ggt1* serait envisageable après transfert dans l'air, puisque l'activité photorespiratoire est réduite chez ces mutants dans l'air. Après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, ces plantes présentaient une inhibition de la photosynthèse marquée, ainsi qu'un plus faible ETR photosynthétique, qui ensemble, pourraient expliquer une baisse de l'assimilation des nitrates :

- La diminution de l'ETR va diminuer la production de Fd<sub>réduite</sub>, qui pourrait limiter l'activité de la NiR et de la Fd-GOGAT, mais aussi la production de NADPH. Dans ce cas, moins de pouvoir réducteur serait exporté hors du chloroplaste par la valve malate, et cela pourrait limiter l'activité de la NR qui a besoin de NADH.
- La forte diminution de la fixation de CO<sub>2</sub> pourrait diminuer la production d'acides organiques. Or, l'assimilation d'azote a besoin de squelettes carbonés pour fixer les molécules d'azote inorganique, et donc une limitation en carbone peut aussi limiter l'assimilation d'azote.

L'analyse de plantes *ggt1* cultivées dans l'air a révélée que la fixation de CO<sub>2</sub> chez ces plantes était réduite, à cause d'une plus faible quantité de RuBisCO par surface de feuilles. Dans Dellerio *et al.*, 2015b, nous avons expliqué celle-ci par l'acclimatation de la plante à la faible activité photosynthétique qui va donc limiter l'assimilation de l'azote par une limitation en squelettes carbonés. Ainsi, lorsque des mutants photorespiratoires sont cultivés dans l'air, ou bien suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, dans les deux cas, il y a une baisse de l'activité photorespiratoire qui aboutit à une diminution de la quantité de RuBisCO probablement à cause d'une réduction de l'assimilation d'azote.

Pour le mutant *amiRgox1/2*, suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, la quantité de RuBisCO diminuait de 80% par rapport au contrôle dans les feuilles les plus âgées après 5 jours. Cependant, la fixation de CO<sub>2</sub>, de même que la quantité de chlorophylles et de protéines totales solubles, était fortement réduite chez cette plantes par rapport au contrôle. La plante présentait un phénotype comparable à celui observé lors de la sénescence, suggérant donc que la RuBisCO était probablement dégradée. Ainsi, la plus faible quantité de RuBisCO dans les feuilles de cette lignée pourrait s'expliquer d'une part par la faible fixation de CO<sub>2</sub> qui limiterait l'assimilation des nitrates dans les feuilles (voir plus haut les hypothèses proposées



**Figure 15.** Modèle du mécanisme initial de réduction de la quantité de RuBisCO chez les mutants photorespiratoires, suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air.

pour les mutants *ggt1*) et d'autre part par l'entrée en sénescence. Il semblerait que l'ensemble des données aille dans le sens d'un mécanisme universel d'inhibition de l'assimilation d'azote *via* l'inhibition de la photorespiration chez les plantes. Ce mécanisme reposerait sur l'inhibition de la photosynthèse dans l'air (Figure 15).

#### **Perspectives à court terme:**

L'hypothèse d'une baisse de l'assimilation de l'azote chez les mutants photorespiratoires après leur transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air pourrait être testée. Des plantes contrôles, *amiRgox1/2* et *ggt1* pourraient être cultivées en hydroponie en fort CO<sub>2</sub>. Puis lors d'un transfert dans l'air, des marquages au <sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 99% seraient réalisés en parallèle de la condition témoin non-marquée. La quantité d'azote totale rentrante dans les feuilles et les racines chez ces lignées pourra être calculée à partir de l'analyse des échantillons par IRMS (grâce à la signature isotopique de l'azote). Si des différences d'absorption et/ou de transport d'azote sont observées, les échantillons de feuilles pourront être analysés par GC-MS, afin d'observer s'il y a des différences de marquage <sup>15</sup>N dans les acides aminés (traduisant une assimilation d'azote différente et/ou une altération de l'allocation de l'azote). Des fractions protéiques pourront aussi être analysées en spectrométrie de masse afin de détecter l'incorporation du marquage <sup>15</sup>N dans les protéines.

## **IV. La forte inhibition de la photosynthèse chez les mutants photorespiratoires déclenche la mise en place de la sénescence**

La sénescence est un processus de mort cellulaire programmée, jouant un rôle majeur dans la vie de la plante en remobilisant des nutriments des organes sources vers les organes en développement. Ce processus est particulièrement important pour les plantes céréalières lors du développement et au cours du remplissage du grain. Par conséquent, l'amélioration du recyclage de l'azote pendant la sénescence représente une cible de choix pour augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote chez des plantes d'intérêt agronomique comme c'est déjà le cas chez le colza, l'orge et le blé (Avice et Etienne, 2014 ; Distelfeld *et al.*, 2014). Il existe deux types de sénescence : la sénescence naturelle (déclenchée par des changements dus à l'âge de l'organe et/ou de la plante) et la sénescence induite (déclenchée par des signaux environnementaux) (Schippers, 2015). Généralement, la sénescence naturelle est déclenchée

par la forte accumulation d'hormones (éthylène, acide abscissique, acide jasmonique, acide salicylique) dans les feuilles, ou bien la diminution de la quantité de brassinostéroïdes. La sénescence induite peut être déclenchée par différents stress : l'obscurité prolongée, un stress sècheresse, un stress salin, une attaque de pathogènes, une faible concentration en azote dans le milieu, une forte ou faible concentration en sucres dans le milieu *in vitro* (van Doorn, 2008 ; Guo et Gan, 2012 ; Schippers, 2015). Dans tous les cas, cela conduit à l'expression de SAGs (Senescence Associated Genes) dont certains codent des protéases qui vont dégrader les protéines de feuilles, en particulier celles des chloroplastes (qui représentent plus de 50% des protéines totales foliaires) (Roberts *et al.*, 2012). Les acides aminés issus de cette dégradation sont ensuite exportés vers des organes puits *via* le phloème (Avila-Ospina *et al.*, 2014). En parallèle, la chlorophylle est aussi dégradée (Pruzinska *et al.*, 2005), et l'azote qui en est issu pourra être refixé sur des acides organiques pour l'export.

Plusieurs mutants photorespiratoires développent un jaunissement de leurs vieilles feuilles après leur transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air (Timm *et al.*, 2012). C'est le cas du mutant *amiRgox1/2* dans lequel, suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, les feuilles les plus âgées devenaient jaunes, tandis que les plus jeunes feuilles restaient vertes, en plus d'un retard de croissance. Les quantités de chlorophylles, de RuBisCO et de protéines totales solubles par surface dans les feuilles les plus âgées de ce mutant diminuaient fortement après 5 jours par rapport au contrôle (80% de RuBisCO, 67% de protéines totales et 70% de chlorophylles en moins). De plus, les transcrits du gène *SAG12*, codant une cystéine protéase spécifiquement exprimée lors de la sénescence (He et Gan, 2002) s'accumulaient 3000 fois plus dans ces feuilles après 5 jours de transfert par rapport au contrôle. Les quantités de nombreux acides aminés dans les feuilles les plus âgées du mutant *amiRgox1/2* augmentaient graduellement par rapport au contrôle suite au transfert. Parmi les acides aminés détectés, plus de 50% du total était de la Gln après 5 jours de transfert chez la lignée *amiRgox1/2*, contre seulement 20% chez la lignée contrôle.

Ces changements de quantité de protéine, de RuBisCO, de chlorophylles et de transcrits *SAG12* dans les feuilles les plus âgées ressemblent fortement à ceux observables lors de l'apparition de la sénescence naturelle et/ou induite chez des plantes sauvages:

- Chez *A. thaliana*, l'apparition de la sénescence naturelle après 50 et 85 jours ainsi que l'apparition de la sénescence induite après 4 à 6 jours d'obscurité s'accompagnent d'une

forte réduction de la quantité de RuBisCO dans les feuilles. De même, ces feuilles-là jaunissant rapidement, démontrant donc que la quantité de chlorophylles diminue aussi. En parallèle, les transcrits du gène *SAG12* sont entre 1000 et 10000 fois plus accumulés dans ces conditions par rapport à la condition témoin (Keech *et al.*, 2010).

- Chez *A. thaliana*, l'apparition de la sénescence induite par l'obscurité s'accompagne d'une réduction de la quantité de chlorophylles dans les feuilles (40% après 3 jours et 90% après 7 jours) (Seltmann *et al.*, 2010).
- Chez *A. thaliana*, l'apparition de la sénescence naturelle s'accompagne d'une réduction de la quantité de chlorophylles dans les feuilles et d'une augmentation de la quantité de transcrits du gène *SAG12* (Watanabe *et al.*, 2013).
- Chez l'orge, l'apparition de la sénescence induite par l'obscurité s'accompagne d'une réduction de 75% de la quantité de chlorophylles, de 60% de la quantité de protéines solubles, et d'une forte diminution de la quantité de RuBisCO après 7 jours (Avila-Ospina *et al.*, 2015).
- Chez l'orge, l'apparition de la sénescence induite par de fortes ou faibles concentrations en nitrates dans le milieu de culture s'accompagne d'une diminution de 50% de la quantité de chlorophylles et de protéines solubles, ainsi que d'une diminution de la quantité de RuBisCO dans les feuilles sénescences par rapport aux jeunes feuilles (Avila-Ospina *et al.*, 2015).

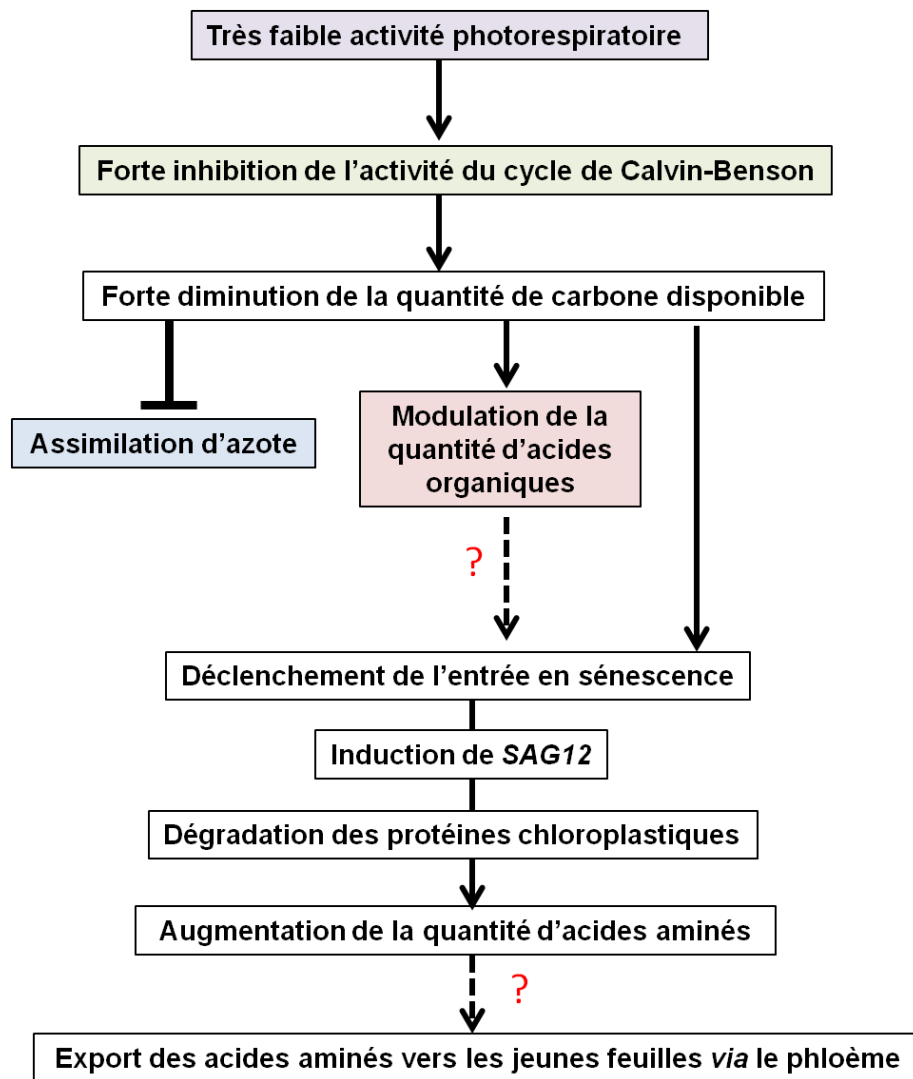
Ces observations démontrent que le mutant *amiRgox1/2* rentre effectivement en sénescence. Des changements similaires ont été observés chez le mutant *shm1-1*, qui après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, présente une augmentation graduelle de la quantité de Val, Ile, Phe, Trp et Tyr associée à une augmentation de la quantité de transcrits *SAG12* par rapport au contrôle. Les quantités de pigments chlorophylliens sont aussi réduites dans les feuilles de ce mutant après ce transfert par rapport au contrôle (Kuhn *et al.*, 2013).

La ressemblance de ces symptômes de sénescence chez les mutants photorespiratoires pour les enzymes GOX et SHMT, mais aussi le phénotype de sénescence du mutant pour l'enzyme GLYK suggèrent que le ralentissement de l'activité photorespiratoire et/ou différentes conséquences dues à ce ralentissement provoqueraient le déclenchement de la sénescence chez ces mutants photorespiratoires après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Le ralentissement de l'activité photorespiratoire inhibe la fixation de CO<sub>2</sub> après transfert dans l'air chez les mutants photorespiratoires. Or, cette forte inhibition de la photosynthèse pourrait



produire une pénurie de carbone. C'est le cas dans le mutant *amiRgox1/2*, où 50% du carbone nouvellement assimilé reste bloqué dans le glycolate. Cette pénurie pourrait donc « mimer » en partie l'induction de la sénescence par de l'obscurité prolongée, où la fixation de carbone n'a plus lieu, en plus de la dérégulation du rythme circadien (Schippers, 2015).

Par ailleurs, chez le mutant *amiRgox1/2*, la diminution de la photosynthèse entraîne une diminution de l'allocation de carbone vers certains acides organiques liés au cycle de Krebs : le fumarate, le malate et l'oxaloacétate. Un mutant d'*A. thaliana* surexprimant l'enzyme malique à NAD de maïs rentre plus rapidement en sénescence que le contrôle lors d'une obscurité prolongée, avec une plus faible quantité de fumarate dans ses feuilles, mais une plus grande quantité de succinate et de malate. Les auteurs ont proposé que la pénurie de carbone mais aussi la faible quantité de certains acides organiques chez cette plante déclenchaient la sénescence (Fahnenstich et al., 2007). Toujours chez *A. thaliana*, l'apparition de la sénescence naturelle s'accompagne d'une diminution de la quantité de fumarate, de malate, de 2-oxoglutarate et de succinate (Watanabe *et al.*, 2013). Chez le mutant *amiRgox1/2*, la quantité de fumarate et de citrate n'est pas altérée après transfert dans l'air, par contre la quantité de succinate et de malate augmentent après transfert par rapport au contrôle. Chez le mutant *shml-1*, la quantité de fumarate n'augmente pas après transfert dans l'air, par contre les quantités de succinate et de malate sont aussi fortement augmentées (Kuhn *et al.*, 2013). Malgré quelques corrélations entre les mutants photorespiratoires, le lien entre la quantité d'acides organiques liés au cycle de Krebs et le déclenchement de la sénescence reste encore un peu flou. La sénescence observée chez les mutants photorespiratoires pour les enzymes GOX, SHMT et GLYK après transfert dans l'air serait donc essentiellement déclenchée par la pénurie de carbone induite par l'inhibition de la photosynthèse. Cette sénescence serait donc ressemblante à celle induite par l'obscurité. Pourtant, la quantité de nombreux acides aminés dans les feuilles les plus âgées du mutant *amiRgox1/2* et du mutant *shml-1* augmente graduellement par rapport au contrôle suite au transfert dans l'air. Or, chez l'orge, l'apparition de la sénescence induite par l'obscurité s'accompagne d'une diminution de 70% de la quantité d'acides aminés totaux dans les feuilles sénescentes par rapport aux jeunes feuilles (Avila-Ospina *et al.*, 2015). Par contre, chez *A. thaliana*, l'apparition de la sénescence naturelle s'accompagne d'une augmentation de la quantité de nombreux acides aminés (Leu, Val, Ile, Thr, Ser, Ala, Trp, Tyr, Asn, Pro, Gly, Phe) (Watanabe *et al.*, 2013). Il reste donc difficile de définir exactement le type de sénescence observé chez les mutants photorespiratoires pour les enzymes GOX, SHMT et GLYK. Au vu de nos observations, cette sénescence serait



**Figure 16.** Modèle de mise en place des symptômes de sénescence chez les mutants photorespiratoires, suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air.

déclenchée par une forte inhibition de la photosynthèse dans l'air et provoquerait des symptômes liés tantôt à la sénescence naturelle, et tantôt à la sénescence induite par l'obscurité.

Le déclenchement de la sénescence n'a pas été observé chez les mutants *ggt1* suite à 12 jours de transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Cependant, l'entrée en sénescence serait essentiellement déclenchée par une forte inhibition de l'activité photosynthétique. Or, l'inhibition de la photosynthèse chez les mutants *ggt1* est d'environ 40% par rapport au contrôle contre 55% pour le mutant *amiRgox1/2* et 78% pour les mutants *shm1-1* et *glyk1* (Dellero *et al.*, 2015b ; Dellero *et al.*, soumis ; Timm *et al.*, 2012). Il existe peut-être un seuil d'inhibition de la photosynthèse, situé entre 40 et 55% d'inhibition par rapport au contrôle, qui déclencherait l'entrée en sénescence chez les mutants photorespiratoires. Il est aussi possible que d'autres facteurs s'ajoutent à l'inhibition de la photosynthèse, qui seraient spécifique pour chaque mutant et peut-être liés à leur positionnement dans le cycle photorespiratoire et les interactions avec d'autres voies métaboliques. Néanmoins, il semblerait que l'inhibition de la photosynthèse soit un facteur majeur (Figure 16).

Egalement, lorsque les mutants *ggt1* et *amiRgox1/2* sont cultivés dans l'air, un fort retard de croissance est observé, mais ils ne montrent aucun symptôme de sénescence après 5 semaines de croissance et pourtant, la fixation de CO<sub>2</sub> chez ces petites plantes est réduite. L'étude des mutants *ggt1* a révélé que ces plantes s'étaient adaptées en diminuant leur croissance en même temps que la quantité de RuBisCO dans leurs feuilles, permettant ainsi de conserver leur balance carbone/azote, en accord avec leur faible fixation de CO<sub>2</sub>. Cela démontre que le phénotype de déclenchement de la sénescence observé chez les mutants photorespiratoires serait dépendant du stade de développement des plantes. Par conséquent, il est difficile de comparer ce qu'il se passe dans des plantes transférées de fort CO<sub>2</sub> dans l'air après 6 semaines de croissance et des plantes cultivées en air uniquement. Il est probable que des symptômes différents seraient observables si les plantes étaient transférées dans l'air après uniquement 4 semaines de culture en fort CO<sub>2</sub>, ou bien après deux semaines, par exemple.

### **Perspectives à court terme:**

Afin de tester l'hypothèse d'une remobilisation de l'azote des feuilles âgées sénescentes vers les jeunes feuilles chez le mutant photorespiratoire *amiRgox1/2* via le transport d'acides aminés, des plantes contrôles, *amiRgox1/2* et *compl* pourraient être cultivées en hydroponie

en fort CO<sub>2</sub>. Un « pulse » de marquage au  $^{15}\text{NO}_3^-$   $^{15}\text{NH}_4^+$  99% serait réalisé quelques jours avant leur transfert, afin d'avoir un pool d'azote marqué et en partie assimilé dans les feuilles. Puis, les quantités d'azote marquées seraient analysées dans les jeunes et les vieilles feuilles par IRMS (azote total et protéines) et GC-MS (acides aminés) à différents temps après leur transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air. Il serait aussi intéressant d'analyser les changements après un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air chez des mutants photorespiratoires d'âges différents.

# **Perspectives générales**

La photorespiration est une voie majeure du métabolisme primaire des plantes qui joue un rôle déterminant pour le bon déroulement de leur croissance et de leur développement. Ceci serait en grande partie dû à sa forte connexion avec d'autres voies du métabolisme primaire comme le cycle de Calvin-Benson, la biosynthèse des acides aminés, l'assimilation de l'azote, le cycle de Krebs et le métabolisme  $C_1$ . Au cours de cette thèse, nous avons essayé d'apporter des éléments de réponse sur le(s) mécanisme(s) d'inhibition de la photosynthèse chez les mutants photorespiratoires, mais aussi sur le processus de déclenchement de la sénescence chez certains de ces mutants suite à un transfert de fort  $CO_2$  dans l'air. L'analyse des mutants *ggt1* dans l'air et suite à un transfert de fort  $CO_2$  dans l'air, a permis de proposer un modèle pour expliquer leur phénotype dans l'air, qui est étroitement lié à la régulation de leur balance carbone/azote. La caractérisation de ces mécanismes a permis d'apporter des informations supplémentaires pour la compréhension du fonctionnement du métabolisme primaire chez les plantes. Cependant, tout n'est pas encore connu en ce qui concerne le cycle photorespiratoire. Par exemple, l'identification de certains transporteurs de métabolites photorespiratoires entre les différents compartiments nous manque toujours. La régulation de l'activité de cette voie par des modifications transcriptionnelles et/ou post-traductionnelles en réponse à diverses contraintes environnementales n'est pas encore connue. Enfin, dans le cadre des besoins socio-économiques et des appels d'offres de projets de recherche nationaux et internationaux, il serait nécessaire de trouver des applications en lien avec les informations fondamentales recueillies sur la photorespiration.

## **I. L'identification des transporteurs de métabolites photorespiratoires**

Depuis l'identification du premier mutant photorespiratoire par Somerville et Ogren il y a 36 ans, de nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation des enzymes jouant un rôle majeur pour la réalisation du cycle photorespiratoire, mais aussi pour le bon déroulement des interactions avec d'autres voies du métabolisme primaire (par exemple, l'assimilation de l'azote). A ce jour, toutes les enzymes impliquées dans la photorespiration ont été identifiées et assez bien caractérisées, surtout grâce au séquençage du génome d'*Arabidopsis* et aux approches de génétique inverse. Par contre, très peu de transporteurs de métabolites photorespiratoires sont connus. Or la connaissance de ces transporteurs pourrait être cruciale pour identifier des étapes limitantes dans la photorespiration (des étapes autres que la

GDC/SHMT). L'identification de ces transporteurs permettrait aussi de créer un modèle plus robuste pour essayer de modéliser le flux du cycle photorespiratoire. En effet, un modèle pour prédire le comportement de ce flux en réponse aux changements environnementaux serait utile dans le cadre de plantes d'intérêt agronomique. Plusieurs transporteurs ont déjà été identifiés : les transporteurs de dicarboxylates chloroplastiques pour le glutamate, le 2-OG et le malate (DiT1, DiT2.1 et DiT2.2) par une approche de génétique inverse (Somerville et Ogren, 1983 ; Renné et al., 2003) et plus récemment, le transporteur de glycérate/glycolate chloroplastique (PLGG1) par une approche de gène candidat suivant une analyse de co-expression avec 11 gènes photorespiratoires (Pick *et al.*, 2013). Cependant, à ce jour, aucun autre transporteur n'a pu être identifié. En effet, deux problèmes majeurs se posent pour pouvoir identifier les transporteurs photorespiratoires:

- 1) La redondance fonctionnelle d'une activité de transport avec d'autres protéines et donc une absence de phénotype photorespiratoire dans l'air.
- 2) L'implication d'un transporteur dans le transport de métabolites non-exclusivement photorespiratoires et donc une absence de co-expression avec les autres gènes photorespiratoires.

Ainsi, une solution alternative pourrait être la réalisation d'analyses protéomiques sur des membranes d'organites préalablement isolées, afin d'identifier de nouveaux transporteurs comme candidats pour des études de génétique inverse et de mesures d'activité *in vitro*. Une telle approche a déjà été publiée pour les membranes de peroxysome, mais elle ne s'est pas révélée très concluante (Reumann *et al.*, 2009).

## II. La régulation des enzymes photorespiratoires par phosphorylation

La régulation des enzymes de la photorespiration au niveau transcriptionnel et/ou post-traductionnel constitue l'un des aspects les moins explorés. La quantité de certains transcrits codant des enzymes photorespiratoires (HPR, SGAT, protéine H de la GDC, GOX, SHMT, RBCS) est augmentée à la lumière, impliquant la possibilité d'une régulation positive de ces gènes par le rythme circadien (voir introduction). Cependant, aucune corrélations n'ont pu être observées entre la variation des « transcrits photorespiratoires » et l'intensité photorespiratoire variée artificiellement (air à 50%, 21% ou 2% O<sub>2</sub>) chez des plantes Col-0 d'*A. thaliana* sur une cinétique de 8 heures de lumière (Florian *et al.*, 2014b). Les régulations



transcriptionnelles sont souvent le résultat d'une acclimatation à long terme à une condition environnementale. Par contre, les modifications post-traductionnelles sont souvent une réponse à court terme qui permet de maintenir l'homéostasie d'une cellule. Ces dernières permettent donc de modifier le flux à travers une voie en très peu de temps. La connaissance de ces modifications permettrait de réguler potentiellement le flux photorespiratoire chez des plantes d'intérêt agronomique. Au niveau post-traductionnel, plusieurs protéines photorespiratoires (RBCS, RBSL, GOX1, protéines P, H et L de la GDC, HPR, SGAT, CAT) ont été identifiées comme étant nitrosylées dans des conditions « normales » mais aussi lors de stress (incubation de la cellule avec un éliciteur bactérien) chez plusieurs espèces végétales. La nitrosylation réduisait l'activité *in vitro* des protéines RBCS, RBSL, GOX1, protéines P et H de la GDC (Abat *et al.*, 2008b ; Palmieri *et al.*, 2010 ; Ortega-Galisteo *et al.*, 2012) suggérant ainsi une régulation négative de la photorespiration par nitrosylation. Parmi les modifications post-traductionnelles les plus répandues figure la phosphorylation protéique. Or, plusieurs phosphopeptides appartenant à des protéines photorespiratoires ont déjà été identifiées par des études de phosphoprotéomiques (voir introduction) : PGLP1, GOX1/2, GGT1, SGAT, les protéines H1/3, P1/2 et T1 du complexe GDC, SHMT1, et HPR1/2. Cependant l'effet de ces phosphorylations sur l'activité de chaque enzyme n'est pas connu. Néanmoins, les premiers résultats au laboratoire démontrent que certaines phosphorylations de la GOX et de la HPR mènent à l'inhibition de leur activité enzymatique *in vitro* (Jossier, Liu, Glab, Oury, Hodges, données non publiées). Il faudrait donc essayer de trouver des modifications post-traductionnelles qui puissent augmenter l'activité de certaines enzymes photorespiratoires comme la GDC et/ou la SHMT dans l'avenir. En effet, des plantes avec une plus forte activité de ces enzymes montrent une meilleure croissance (Timm *et al.*, 2013b ; Timm *et al.*, 2015).

En ce moment au laboratoire, l'effet de la phosphorylation sur les enzymes photorespiratoires est en train d'être testé *in vitro*. L'acide aminé phosphorylé dans chaque protéine va être remplacé par un acide aminé pouvant mimer la phosphorylation (un aspartate, par exemple) ou non (une alanine ou valine) par mutagenèse dirigée. Les protéines recombinantes modifiées sont ensuite produites et leurs propriétés enzymatiques étudiées ( $K_m$  et  $V_{max}$ , pH optima,  $K_i$  d'inhibiteur(s)). Par la suite, l'effet de la phosphorylation sera analysé *in planta* chez *A. thaliana*, en complétant le mutant photorespiratoire associé à chaque enzyme avec les formes modifiées de la protéine (phosphorylation-mimique et non-phosphorylable).

Les deux premières perspectives proposées s'orientent vers une recherche fondamentale. Cependant, dans les appels à projets, il est souvent demandé aux chercheurs un apport socio-économique à partir de leurs travaux de recherche. Pour les plantes, ces apports sont essentiellement :

- Une meilleure résistance de la plante aux différents stress perçus dans les conditions de cultures (*e.g.* sécheresse, pathogènes, température).
- Une plus faible utilisation de fertilisants et/ou de pesticides (intrants).
- Une production de biomasse plus importante (et pour moins d'intrants).
- Une augmentation de leur qualité nutritionnelle.

Ainsi, les perspectives qui vont suivre présentent des possibilités d'applications à des plantes d'intérêt agronomique avec un bénéfice socio-économique à la clé.

### III. Le rôle de la photorespiration dans la réponse aux attaques de pathogènes

Les interactions entre la photorespiration et le métabolisme primaire des plantes sont assez complexes, et il est parfois difficile de les interpréter, notamment de part la multiplicité de ces interactions. Durant cette thèse, des éléments de réponse ont été apportés sur les mécanismes impliqués dans certaines de ses interactions comme avec la photosynthèse. Un autre type d'interaction entre la photorespiration et le métabolisme des plantes est encore peu étudié : c'est le rôle de la photorespiration dans la résistance aux pathogènes. En effet, plusieurs études ont montré que la GOX jouait un rôle positif dans la réponse aux attaques de pathogènes chez *A. thaliana*, *V. vinifera* et *N. benthamiana* (Rojas *et al.*, 2012 ; Rojas et Mysore, 2012 ; Gambino *et al.*, 2013 ; Gilbert et Wholpert, 2013 ; Launay, 2014). Mais il ne faut pas généraliser ces réponses à toutes les plantes car chez le riz, la GOX pourrait jouer un rôle négatif (Chern *et al.*, 2013). Ce rôle de la GOX reposerait essentiellement sur la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indépendamment de la NADPH oxydase (Rojas *et al.*, 2012). Pendant ma thèse, j'ai collaboré avec l'équipe de Mathilde Fagard (IJPB, INRA, Versailles) sur la caractérisation du rôle de la protéine GOX2 dans la réponse au facteur d'avirulence DspA de la bactérie *Erwinia amylovora*. Les mesures d'activités GOX que j'ai effectuées sur des plantes surexprimant DspA, des plantes mutantes *gox2* et sur des plantes révertantes de l'effet de DspA (mutations ponctuelles dans le gène *GOX2*) n'ont pas été conclusives quant au rôle spécifique de l'activité GOX2 dans la réponse à cet effecteur. Chaque lignée révertante de

l'effet de DspA possédait une mutation ponctuelle dans le gène *GOX2* sur un résidu non impliquée dans le site actif. Les protéines recombinantes associées à cette forme mutée du gène ont été produites *in vitro*, et aucune différences significatives des paramètres enzymatiques avec le glycolate n'ont été observées. Ce serait peut-être l'interaction entre DspA et GOX2 qui serait déterminante pour la réponse à l'attaque de ce pathogène. En effet, certains facteurs d'avirulences des pathogènes peuvent être reconnus spécifiquement par des protéines des plantes (codées par des gènes de résistances), permettant ainsi de stopper l'effet néfaste de ces facteurs. Dans un premier temps, l'interaction entre GOX2 et DspA pourrait être testée par :

- Complémentation de fluorescence bimoléculaire: les deux parties d'une protéine fluorescente sont greffées sur les protéines d'intérêts et elles sont exprimées dans des protoplastes. L'interaction des protéines permet d'observer de la fluorescence en microscopie confocale.
- Co-immunoprécipitation : La protéine d'intérêt en complexe avec d'autres protéines est isolée par précipitation avec un anticorps spécifique. Les protéines sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse.

D'autres protéines photorespiratoires seraient aussi impliquées dans la réponse aux attaques de pathogènes : les protéines P, T et H du complexe GDC chez le tabac (Navarre et Wolpert, 1995 ; Gilbert et Wolpert, 2013) et la protéine HPR chez le soja (Okinaka *et al.*, 2002). Dans certains cas, c'est la reconnaissance spécifique de protéines d'avirulence qui est mis en cause, et dans d'autres cas, c'est la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> photorespiratoire qui serait importante. Afin de déterminer le(s) rôle(s) majeur(s) de la photorespiration dans la réponse aux attaques de pathogènes chez les plantes, des expériences d'inoculation des feuilles de plantes sauvages avec divers pathogènes (bactéries, champignons et herbivores) pourraient être réalisées en conditions de fort CO<sub>2</sub> et dans l'air chez plusieurs espèces (peut-être avec *A. thaliana* dans un premier temps, puis avec des plantes d'intérêt agronomique si les résultats sont concluants). Le rôle d'enzymes photorespiratoires spécifiques pourrait être étudié en comparant les réponses aux attaques de pathogènes chez des plantes sauvages et mutantes *via* des analyses de la croissance du pathogène, de la production de callose, de la fuite d'électrolytes, de l'apparition ou non de la mort cellulaire, de la production des ROS etc. Puis, il serait intéressant de regarder s'il y a des changements de l'état de phosphorylation des protéines photorespiratoires suite aux attaques de différentes pathogènes.

## IV. La surexpression de gènes codant les enzymes GDC et SHMT chez des plantes d'intérêt agronomique

L'augmentation de la population mondiale associée à une diminution de la surface de terres cultivables dans le monde d'ici 2050 souligne l'urgence d'obtenir des plantes avec un fort rendement (biomasse et/ou grains par exemple) et/ou une plus faible utilisation d'engrais, afin de limiter la pollution des sols et des nappes phréatiques, et de pesticides, pour des raisons de santé publique (Maurino et Weber, 2013). L'introduction de voies alternatives afin de réduire les pertes de carbone et/ou d'azote associées au cycle photorespiratoire, ainsi que le coût énergétique de cette voie, a déjà été réalisée avec des résultats encourageants : 50% de masse sèche et 30% de diamètre de rosette en plus chez *A. thaliana* (Kebeish *et al.*, 2007), 230% de tubercules en plus chez *S. tuberosum* (Nölke *et al.*, 2014). Une autre stratégie qui semblerait fonctionner repose sur la surexpression de protéines photorespiratoires qui se situent à des étapes limitantes. Chez *A. thaliana*, la surexpression de la protéine H du complexe GDC augmente significativement la fixation de CO<sub>2</sub> par la plante, associée à une augmentation de la production de biomasse (Timm *et al.*, 2013b). Chez *O. sativa*, des lignées surexprimant la SHMT présentent une meilleure efficacité photosynthétique, ainsi qu'un meilleur rendement en grain que la lignée contrôle (20% en plus) (Wu *et al.*, 2015). Dans un premier temps, la surexpression des enzymes GDC et SHMT pourrait être réalisée chez *A. thaliana*, afin d'observer s'il y a un effet additif de ces surexpressions sur l'augmentation de la biomasse et du rendement en grains. Dans un deuxième temps, la surexpression de ces enzymes chez des plantes d'intérêt agronomique pourrait être envisagée, comme chez le blé ou le colza. Mais, les approches présentées ci-dessus conduisaient à la production de plantes OGM. Or pour des raisons politiques (sous le nom du principe de précaution) les OGM ne sont pas la bienvenue dans la plupart des pays en Europe, dont la France. Cependant, il est possible de produire des plantes qui surexpriment ces enzymes sans aboutir à la production des plantes dites OGM.

Dans un premier temps, l'idée sera de trouver des mutations dans le génome d'*A. thaliana*, qui mènent à la surexpression des enzymes cibles (SHMT/GDC). Pour cela, des plantes sauvages doivent être transformées avec une construction comprenant un gène rapporteur (comme la luciférase) sous le contrôle du promoteur de nos gènes d'intérêts. Par la suite, une mutagenèse de type EMS sera réalisée sur les graines de ces plantes, et la descendance sera criblée grâce au gène rapporteur afin de repérer des plantes avec une plus forte luminescence

(dans le cas de la luciférase). La mutation sera identifiée dans les descendants suite aux croisements avec des plantes sauvages par cartographie et le séquençage haut débit de l'ADN génomique. Ensuite, la mutation conduisant à la surexpression de notre gène cible sera recherchée dans des plantes d'intérêt agronomique. Deux stratégies sont envisageables :

- Par TILLING où la mutation est recherchée dans des banques d'ADN génomique issues de plantes mutagénéisées à l'EMS. Pour cela, il faut soit rechercher dans des banques déjà disponibles, soit faire une banque spécifique pour la plante d'intérêt agronomique si elle n'existe pas.
- Par « genome editing » avec les protéines CRISPR/CAS-9 qui permettent de modifier spécifiquement une région génomique de l'ADN d'une plante. Des cassures doubles brins sont induites à l'endroit d'intérêt du génome et la réparation va permettre d'enlever une partie de l'ADN ou bien de modifier la séquence. Ceci a déjà été réalisé avec succès chez *Arabidopsis* et chez le riz (Feng *et al.*, 2013). Dans ce cas-là, les protéines CRISPR et CAS-9 doivent être exprimées chez la plante à modifier, et l'édition du génome doit être réalisée sur des plantes hétérozygotes pour les transgènes exprimants les protéines CRISPR et CAS-9. Il sera donc possible de sélectionner par la suite des plantes qui portent la mutation d'intérêt mais qui ne contiennent plus les transgènes après autofécondation et ségrégation.

# **Matériel et méthodes**

## I. Matériel

### 1) Souches bactériennes

#### a) Souches d'*Escherichia coli*

**BL21 (DE3)** : La souche BL21 (DE3) a été utilisée pour la production de protéines recombinantes. Son génotype est :  $F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])$ .

**DB3.1** : La souche DB3.1 a été utilisée pour l'entretien des vecteurs de type Gateway® contenant le gène suicide *ccdB*, qui code une protéine bloquant la croissance de la bactérie par son interaction avec la gyrase à ADN. La souche DB3.1 possède une mutation dans le gène codant cette enzyme, permettant sa croissance en présence des plasmides Gateway®. Son génotype est :  $F^- gyrA462 endA1 glnV44 \Delta(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B^-, m_B^-) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^r) xyl5 \Delta leu mtl1$ .

**DH5 $\alpha$**  : La souche DH5 $\alpha$  a été utilisée lors des expériences de clonage « classique ». Son génotype est :  $F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG \Phi80dlacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), \lambda^-$ .

#### b) Souche d'*Agrobacterium tumefaciens*

**GV3101::pMP90** : La souche GV3101 a été utilisée lors des expériences de transformation d'*A. thaliana*. Cette souche porte la résistance à la rifampicine sur le chromosome bactérien et la résistance à la gentamycine sur le plasmide pMP90 (pTiC58 $\Delta$ T-DNA) contenant les gènes *vir* pour le transfert d'ADN-T, sans être lui-même porteur d'un ADN-T fonctionnel.

### 2) Plasmides

#### a) Plasmides utilisés pour les clonages

**pDONR207** : Le plasmide pDONR207 de 5585 pb confère la résistance au chloramphénicol et à la gentamycine. C'est un plasmide donneur pour le clonage par le système Gateway® qui possède les sites de recombinaison *attP*. Entre les sites de recombinaison se trouvent le gène de résistance au chloramphénicol et le gène suicide *ccdB* qui code une protéine bloquant la croissance de la bactérie par son interaction avec la gyrase à ADN. Ce plasmide a été utilisé pour le clonage des phases ouvertes de lecture (ORF) des ADNc codant la *GO1* de *Z. mays*, dans le plasmide pK7WG-*proSHMT1*.



**pENTR2B** : Le plasmide pENTR2B de 3800 pb confère la résistance à la kanamycine. C'est un plasmide entrant pour le clonage par le système Gateway<sup>®</sup> qui possède les sites de recombinaison *attL*. Entre les sites de recombinaison se trouvent deux régions de clonage multiple, entre lesquelles se trouve le gène suicide *ccdB*. Ce plasmide a été utilisé pour le clonage du gène *amiRGOX1/2* dans le plasmide pAlligator2.

**pGEM-T Easy<sup>®</sup>** : Le plasmide pGEM-T Easy<sup>®</sup> de 3015 pb confère la résistance à l'ampicilline. Il possède un site de clonage multiple introduit en phase dans le gène *lacZ* codant une  $\beta$ -galactosidase. Lors du clonage, ce gène sera interrompu par la présence de l'insert. L'addition dans le milieu d'un analogue du galactose, le X-gal, dont l'hydrolyse conduit à la formation d'un produit bleu, permet de sélectionner les colonies recombinantes qui resteront blanches (sélection blanc/bleu). Le pGEM-T Easy<sup>®</sup> est commercialisé sous forme linéaire avec les extrémités 3' portant une thymidine sortante. Elles serviront au clonage de produits PCR obtenus avec la Taq polymérase, qui rajoute une adénosine sortante à chaque extrémité 5'. Ce plasmide a été utilisé pour sous-cloner la séquence du promoteur *SMHT1* vers le plasmide pK7WG et les ORF des ADNc des gènes *ZmGO1* et *AtGOX1* dans le plasmide pET28a.

**pRS300*miR319a*** : Le plasmide pRS300 de 3369 pb confère la résistance à l'ampicilline. Il possède un site de clonage multiple, à l'intérieur duquel a été inséré l'ORF de l'ADNc pour le gène *miR319a*. Il offre la possibilité de modifier la séquence du microARN par de multiples PCR selon le protocole de Schwab *et al.*, (2006). Ce plasmide a été utilisé pour construire un gène codant un microARN artificiel pouvant éteindre spécifiquement et simultanément l'expression des gènes *AtGOX1* et *AtGOX2* chez *A. thaliana*.

#### b) Plasmides utilisés pour l'expression de protéines recombinantes

**pET28a** : Le plasmide pET28a de 5369 pb confère la résistance à la kanamycine. Il possède un site de clonage multiple, avec en amont et en aval, une séquence codante une étiquette histidine. Il y a une séquence *lacO* entre le promoteur T7 et le *rbs* (« ribosome binding site »). Ce plasmide contient aussi le gène *LacI*. Le promoteur T7 permet d'induire la production de protéines recombinantes avec une étiquette histidine dans des bactéries contenant l'ARN polymérase du bactériophage T7 (par exemple BL21(DE3)). Cette induction se fait avec un analogue du lactose, l'Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), qui va interagir avec la protéine dérivant du gène *LacI*. Cette protéine se fixe sur la séquence *LacO* en l'absence de

lactose et elle empêche la transcription du gène (système de l'opéron lactose chez la bactérie). L'interaction lactose-protéine LacI permet de lever cette répression, et donc d'induire la transcription de l'ADN d'intérêt. Ce plasmide a été utilisé pour la production des GOX recombinantes avec une étiquette histidine en position N-terminale.

**pET28a-AtGOX2** : Ce plasmide correspond au pET28a dans lequel a été inséré l'ORF de l'ADNc codant la protéine GOX2 d'*A. thaliana*, afin de produire la protéine recombinante avec une étiquette histidine en position N-terminale chez *E. coli*. Il a été fourni par Martin Hägemann (Hackenberg *et al.*, 2011).

**pET28a-AtGOX1** : Ce plasmide correspond au pET28a dans lequel a été inséré l'ORF de l'ADNc codant la protéine GOX1 d'*A. thaliana*, afin de produire la protéine recombinante avec une étiquette histidine en position N-terminale chez *E. coli*. Il a été obtenu au cours de cette thèse (voir la section clonage correspondante).

**pET28a-ZmGO1** : Ce plasmide correspond au pET28a dans lequel a été inséré l'ORF de l'ADNc codant la protéine GO1 de *Z. mays*, afin de produire la protéine recombinante avec une étiquette histidine en position N-terminale chez *E. coli*. Il a été obtenu au cours de cette thèse (voir la section clonage correspondante).

### c) Plasmides utilisés pour la transformation d'*A. thaliana* par *A. tumefaciens*

**pAlligator2** : Le plasmide pAlligator2 de 11 025 pb confère la résistance au chloramphénicol et à la spectinomycine. C'est un plasmide accepteur pour le clonage par le système Gateway®. Il possède un site multiple de clonage, ainsi que le gène *ccdB* qui code une protéine bloquant la croissance de la bactérie par interaction avec la gyrase à ADN. Le site de clonage multiple ainsi que le gène de résistance au chloramphénicol et le gène *ccdB* sont encadrés par des sites *attR*, qui permettent de réaliser une recombinaison avec des fragments d'ADN possédant des sites *attL*, selon le système Gateway®. En amont d'un site de recombinaison se trouve un promoteur 35S CaMV (Cauliflower Mosaic Virus), permettant d'exprimer l'ADN d'intérêt chez les plantes. Ce plasmide contient aussi de l'ADN codant la « Green Fluorescent Protein » (GFP) sous le contrôle d'un promoteur *At2S3* s'exprimant spécifiquement dans l'enveloppe de la graine. Ceci permet de sélectionner les graines de plantes transformées avec ce plasmide par observation de la fluorescence émise par la GFP. Ce plasmide a été utilisé pour générer la lignée *amiRgox1/2*.

**pAlligator2-amiRGOX1/2** : Ce plasmide correspond au plasmide pAlligator2 dans lequel a été inséré l'ORF de l'ADNc du *miR319a* modifié afin de produire un microARN pouvant cibler spécifiquement les ARNm de *GOX1* et de *GOX2* d'*A. thaliana*. Ce plasmide a été utilisé pour la transformation d'*A. thaliana* par agro-infection pour générer des lignées *amiRgox1/2* avec une faible activité GOX foliaire (voir la section clonage correspondante).

**pK7WG** : Le plasmide pK7WG de 10167 bp confère la résistance au chloramphénicol chez les bactéries. Il possède le gène suicide *ccdB*. Les deux gènes (*ccdB* et gène de résistance au chloramphénicol) sont entourés par les sites de recombinaison *attR* qui seront utilisés pour le clonage par le système Gateway®. Ce plasmide a été utilisé pour la transformation de la lignée *amiRgox1/2* par *A. tumefaciens*, dans le cadre de la complémentation de cette lignée.

**pK7WG-proSHMT1::ZmGO1** : Ce plasmide correspond au plasmide pK7WG auquel a été rajouté un fragment de 1 kb de la séquence promotrice du gène *SHMT1* d'*A. thaliana* (voir Voll *et al.*, 2005) ainsi que l'ORF de l'ADNc codant la protéine GO1 de *Z. mays*. Il a été utilisé pour compléter la lignée *amiRgox1/2* d'*A. thaliana*. Il a été obtenu au cours de cette thèse et la stratégie de clonage sera décrite dans la section clonage correspondante.

### 3) Matériel végétal

#### a) Lignée de contrôle

*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia-0 (Col-0) a été utilisée comme plante « sauvage » (contrôle).

#### b) Lignées d'insertion ADN-T

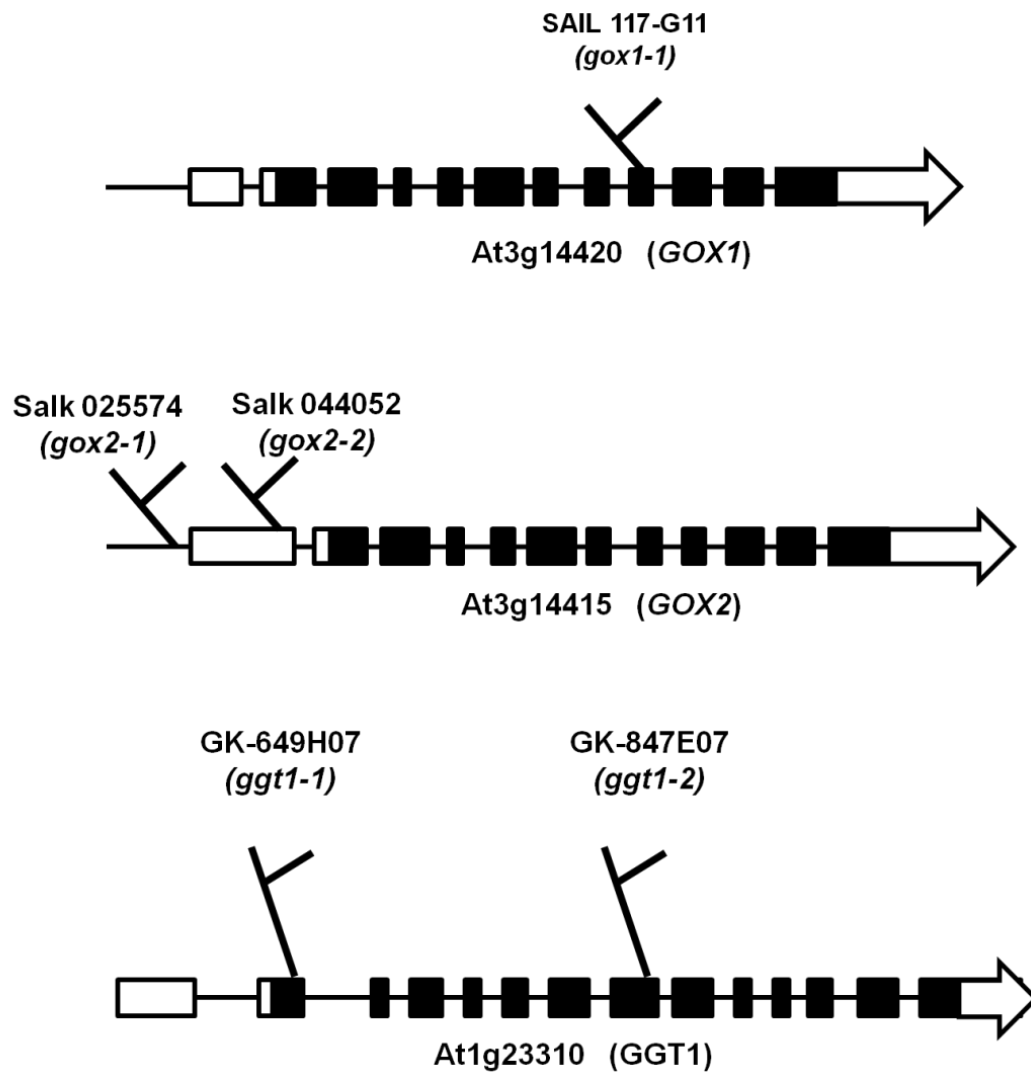
##### GOX

Trois lignées d'insertion ADN-T de site connu chez *A. thaliana* écotype Columbia (Col-0) pour les gènes *GOX1* (At3g14420) et *GOX2* (At3g14415) ont été utilisées (Figure 17):

**SAIL 117-G11 (*gox1*)** : l'ADN-T est inséré dans le neuvième exon du gène *GOX1*.

**SALK\_025574 (*gox2-1*)** : l'ADN-T est inséré 10 bp avant le début de la région 5'UTR du gène *GOX2*.

**SALK\_044052 (*gox2-2*)** : l'ADN-T est inséré dans la région 5'UTR du gène *GOX2*.



**Figure 17.** Schéma de la position des insertions des ADN-T dans les gènes des mutants. Les boîtes blanches représentent les régions UTR, les boîtes noires représentent les exons et les traits noirs continus représentent les introns.

La lignée SAIL est un mutant d'insertion de la collection de Syngenta (Sessions *et al.*, 2002). Les lignées SALK proviennent des mutants répertoriés au Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (voir <http://signal.salk.edu/about.html>) (Alonso *et al.*, 2003).

Les graines de ces mutants ont été commandées au centre de ressources biologiques d'Arabidopsis (ABRC) de l'université de l'Ohio, aux Etats-unis (<https://abrc.osu.edu/>).

***amiRgox1/2***: La lignée *amiRgox1/2* a été générée au cours de cette thèse par Mathieu Jossier, en transformant des plantes Col-0 d'*A. thaliana* avec *A. tumefaciens* contenant le plasmide pAlligator2-*amiRgox1/2*. Cette lignée exprime un *MIR319a* modifié codant un microARN de séquence « TAACATACGAAGCTAAGCCAT » permettant l'extinction de l'expression des gènes *AtGOX1* et *AtGOX2* chez *A. thaliana* écotype Col-0 sous le contrôle d'un promoteur 35S *CaMV*.

***compl*** : Cette lignée a été générée au cours de la thèse par Nathalie Glab et Céline Oury, en transformant la lignée *amiRgox1/2* avec *A. tumefaciens* contenant le plasmide pK7WG-*proSHMT1::ZmGO1*. Le transgène exprime l'ORF de l'ADNc codant la *GO1* de *Z. mays*, sous le contrôle du promoteur du gène *SHMT1*.

## **GGT**

Deux lignées d'insertion ADN-T de site connu chez *A. thaliana* écotype Columbia (Col-0) pour le gène *GGT1* (At1g23310) ont été utilisées (Figure 17):

**GK-649H07 (*ggt1-1*)** : l'ADN-T est inséré dans le deuxième exon.

**GK-847E07 (*ggt1-2*)** : l'ADN-T est inséré dans le huitième exon.

Les lignées « GK » proviennent du centre GABI-Kat de l'université de Bielefeld, en Allemagne (<https://www.gabi-kat.de/>) (Kleinboelting *et al.*, 2012).

## **4) Amorces d'ADN**

### **a) Amorces d'ADN pour le génotypage des mutants d'insertion**

T<sub>h</sub>= Température d'hybridation (en °C) utilisée pour la PCR.

Lignées mutantes	Amorce sens (5' vers 3')	Amorce anti-sens (5' vers 3')	T <sub>h</sub>	Fragment amplifié
<i>gox1</i>	AAC TTGACCTCGGAAAGATGG	TCTGGTTAACGAGAATATGA	60	Col-0
	AAC TTGACCTCGGAAAGATGG	LB1-Sail (GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC)	60	ADN-T

<i>gox2-1</i>	TTGTTATGTTTCGTCAAGCCC	ATACCATGATGGTTCAGCAG	55	Col-0
	LBb1-Salk (GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT)	ATACCATGATGGTTCAGCAG	55	ADN-T
<i>gox2-2</i>	TTGTTATGTTTCGTCAAGCCC	ATACCATGATGGTTCAGCAG	55	Col-0
	TTGTTATGTTTCGTCAAGCCC	LBb1-Salk	55	ADN-T
<i>ggt1-1</i>	CCTTGCCCTTGGCTCTAGAACC	GTCATACCTAAACCGCTGAAGTC	55	Col-0
	LBb1-3 GABI (ATTTTGCCGATTTCGGAAC)	TAACCTCTCCCACTCTTTGCC	55	ADN-T
<i>ggt1-2</i>	AAGACAGACCCTTGGAGGGAG	CTTCAGGAGTTAGGAAAGAGGTT	60	Col-0
	AAGACAGACCCTTGGAGGGAG	LBb1-3 GABI	60	ADN-T

### b) Amorces d'ADN pour les clonages

$T_h$  = Température d'hybridation (en °C) utilisée pour la PCR. Les séquences des sites de restrictions et des sites de recombinaisons Gateway® sont soulignées.

Nom	Amorces (5' vers 3')	$T_h$
promSHMT1HindIII-f	GGA <u>AAGCTT</u> CAGCCTGAACATTCCGATTA	58
promSHMT1SpeI-r	GCACTAGTCATGAACGAGAGAGAGAAGAGA	58
GW-ZmGO1-f	<u>TACAAAAAAGCAGGCTT</u> CATGGGGAGATCACCAATGTC	55
GW-ZmGO1-r	<u>CAAGAAAGCTGGGTC</u> TACAAGCGCGACGGGATG	55
GateWay-f	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC	55
GateWay-r	GGGGACCACTTTGTACAAAGAGCTGGGTC	55
AtGOX1-f	ACACTTCGGCATATGGAGATCACTAACGTT	55
AtGOX-r	ATTTCCCTCGAGTAACCTGGCTGAAGGACG	55
AtGOX1-NheI	CGGCTAGCGAGATCACTAACGTTACCG	55
AtGOX1-XhoI	GGGCTCGAGCTATAACCTGGCTGAAGGAC	55
ZmGO1-NheI	CGGCTAGCGGGGAGATCACCAATGTCATG	55
ZmGO1-XhoI	GGGCTCGAGCTACAAGCGCGACGGGATG	55
amiRNA-GO-I	GATTTGAATCGCTATCCTTGCAACTCTCTTTGTATTCCA	55
amiRNA-GO-II	AGTTGCAAGGATAGCGATTCAAATCAAAGAGAATCAATGA	55
amiRNA-GO-III	AGTTACAAGGATAGCCATTCAATTCACAGGTCGTATATG	55
amiRNA-GO-IV	GAATTGAATGGCTATCCTTGTAACCTACATATATATTCTTA	55
amiRNA-A	CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	55
amiRNA-B	GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG	55

### c) Amorces d'ADN pour la qPCR

La température d'hybridation pour la qPCR était de 60°C pour tous les couples d'amorces.

Gènes	Amorce sens (5' vers 3')	Amorce anti-sens (5' vers 3')
<i>GOX1</i>	GGGACACTCCACGTCCTTC	AGGCTTGTTTTGTGATCTGA
<i>GOX2</i>	CACGGTAACCACATTGTCA	TACGCACGTTTTTGTGATCC
<i>GOX3</i>	TTTAAGAGTCACCACTCATCGAGAGAT	AAAGTATTCGATTATATAGTTGGATGGGA
<i>HAOX1</i>	GAATTAAATCTATGCTCTGATCCTAAAACC	GAACAAGTCCAACGTACTATTGTCTT
<i>HAOX2</i>	AACCAGCAGCCATGTTAGAAGAAC	CACTAACCACATCATTGTGTCAGACA
<i>GGT1</i>	TTCTTCTCTGAACGACTATTGTG	GAATAGGGCAAGAGAAAGAGTG
<i>GGT2</i>	TCACTTCTTCTTTTACAGACA	GAGTTTGACACAGAGTAGGACCA
<i>SAG12</i>	GTTTCCCTTCTTTATTGTGTTG	GTTTCCCTTCTTTATTGTGTTG
<i>Actine2-8</i>	GGTAACATTGTGAGTGGTGG	AACGACCTTAATCTTCATGCT

## II. Méthodes

### 1) Cultures des plantes

#### a) Stérilisation des graines

20 mg de graines d'*A. thaliana* sont stérilisés pendant 6 min par l'ajout de 1 mL d'un mélange éthanol 95% (v/v) / hypochlorite de sodium 7,5% (m/v), puis ces graines sont rincées 2 fois à l'éthanol 95% (v/v) et séchées sous une hotte pendant une nuit.

#### b) Culture *in vitro*

Les graines d'*A. thaliana* sont semées sur milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) 1/2, additionné d'agar 0,8% (m/v), de sucrose 3% (m/v), et d'antibiotiques selon la lignée, puis placées à 4°C à l'obscurité pendant 48h afin de lever la dormance et d'homogénéiser la germination. Les plantes sont cultivées en jours courts (photopériode de 8h de jour et 16 h de nuit à 100  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), avec 65% d'humidité dans l'air, et une température de 20°C/18°C (jour/nuit). La concentration en CO<sub>2</sub> est celle de l'air (autour de 380  $\mu\text{L}.\text{L}^{-1}$ ).

#### c) Culture en terre

Les graines d'*Arabidopsis* sont mises à germer pendant 1 semaine sur terreau (contenant 17% d'azote, 10% de phosphate et 14% de potassium ( $\text{kg}.\text{m}^{-3}$ )). Par la suite, les plantules sont repiquées sur terreau et cultivées en jours courts (photopériode de 8h/16h (jour/nuit) entre 200 et 350  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), avec 65% d'humidité dans l'air, et une température de 20°C/18°C (jour/nuit). Les plantes sont cultivées soit dans une chambre de culture dans l'air (concentration en CO<sub>2</sub> autour de 380  $\mu\text{L}.\text{L}^{-1}$ ) soit dans une enceinte climatique avec une



concentration en CO<sub>2</sub> de 3000 µL.L<sup>-1</sup> dans l'air (HC). Les plantes sont arrosées à l'eau du robinet 2 à 3 fois par semaine.

## 2) Techniques de biologie moléculaire

### a) Techniques courantes

#### i) Dosage des acides nucléiques

Le dosage des acides nucléiques est réalisé avec un spectrophotomètre « NanoDrop ». La densité optique (DO) est mesurée à 260 nm sur 2 µL d'extrait d'ADN ou d'ARN. Une unité de DO équivaut à une concentration en ADN de 50 ng.µL<sup>-1</sup> ou une concentration en ARN de 40 ng.µL<sup>-1</sup>.

#### ii) Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier de façon exponentielle une faible quantité d'ADN double brin. Elle est réalisée dans un volume final de 20 µL avec 0,5 U de Taq polymérase (ADN polymérase de *Thermus aquaticus*, préparée selon le protocole de Desai et Pfaffle, (1995), 100 nM de chaque oligonucléotide (amorces, voir la section I. 4), 100 µM de chaque dNTP (dATP, dTTP, dGTP et dCTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 2 ng d'ADN dans un tampon contenant 10 mM Tris, pH 7,8, 50 mM KCl, 0,1% (v/v) Triton. Généralement la PCR se compose de la séquence suivante : 5 min de dénaturation à 94°C, 35 cycles (15s à 94°C, 30s à la T<sub>h</sub> (°C), 60s par kbp de produit PCR attendu à 72°C), 7 min d'élongation à 72°C puis ∞ à 4°C.

#### iii) Migration des acides nucléiques par électrophorèse sur gel d'agarose

Les acides nucléiques sont mélangés à un tampon de charge (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, bleu de bromophénol 0,03% (m/v), xylène cyanol FF 0,03% (m/v), glycérol 60% (v/v), 60 mM EDTA), puis chargés dans les puits d'un gel d'agarose (1% (m/v) pour de l'ADN et 2% (m/v) pour de l'ARN) réalisé avec le tampon TAE (20 mM Tris-Acétate, pH 8,3, 0,5 mM EDTA) et du bromure d'éthidium (100 µg.L<sup>-1</sup>). Les fragments d'acides nucléiques sont séparés selon leur taille par migration électrophorétique sous une tension de 100 V pendant 20 à 30 min. La taille des fragments est estimée par comparaison avec le profil de migration de marqueurs de taille connue.

### b) Techniques relatives à l'ADN

#### i) Extraction d'ADN génomique « propre »

Des feuilles de rosettes d'*Arabidopsis* sont prélevées dans de l'azote liquide et broyées avec

une bille de fer pendant 90s à 30 Hz au broyeur à billes. L'ADN est extrait dans 400 µL de tampon d'extraction : bromure de cetyltriméthylammonium 2% (m/v), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, β-mercaptoéthanol 0,2% (v/v), 100 mM Tris-HCl, pH 8. Le mélange est incubé à 60°C pendant 30 min puis 400 µL de chloroforme-isoamyl alcool (24 :1) sont ajoutés et le mélange est vortexé. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et 350 µL d'isopropanol sont ajoutés et le mélange est vortexé. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C, le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 70% (v/v), séché sous vide et l'ADN est resuspendu dans de l'eau milliQ stérile.

### ii) Extraction d'ADN génomique « rapide et sale »

Des feuilles de rosettes d'*Arabidopsis* sont congelées à -80°C puis broyées avec une bille de fer pendant 90s à 30 Hz au broyeur à billes. L'ADN est extrait dans 300 µL de tampon d'extraction « Edwards » : 200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 25mM EDTA, 250 mM NaCl et 0,5% SDS (Edwards *et al.*, 1991). Après une centrifugation de 10 min à 10 000 g à 20°C éliminant les débris cellulaires, 300 µl de surnageant sont additionnés de 300 µL d'isopropanol et incubés 5 min à température ambiante, afin de faire précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 20 min à 10 000 g à 4°C, le culot d'ADN est solubilisé dans 100 µL d'eau MilliQ et conservé une semaine à 4 °C.

### iii) Géotypage des lignées d'insertion ADN-T (simples mutants)

Les mutants d'insertion ADN-T pour les gènes d'intérêt sont géotypés par PCR à partir d'ADN génomique de feuilles de rosettes extrait selon Edwards *et al.*, (1991). Brièvement, deux PCR distinctes avec deux couples d'amorces différents sont réalisées sur l'ADN de chaque lignée. Une première PCR amplifie l'allèle « sauvage » du gène en l'absence de l'ADN-T (couple d'amorce qui s'hybride avec le gène de chaque côté de l'insertion), et la deuxième PCR amplifie un fragment si l'ADN-T est inséré dans le gène (allèle mutant du gène) grâce au couple d'amorce qui s'hybride avec l'ADN-T et le gène. Les individus sont alors différenciés par la présence de ces fragments après amplification par PCR :

- Présence d'un fragment de l'allèle sauvage du gène uniquement = plante homozygote sauvage
- Présence d'un fragment de l'allèle sauvage et de l'allèle mutant du gène = plante hétérozygote pour l'insertion de l'ADN-T
- Présence d'un fragment de l'allèle mutant du gène uniquement = plante homozygote pour l'insertion de l'ADN-T

L'amplification par PCR est réalisée sur 2  $\mu$ L d'extrait d'ADN génomique avec la Taq polymérase (voir II. 2) a) ii). Les produits PCR sont séparés sur un gel d'agarose et l'ADN est visualisé sous une lumière UV et identifié selon sa taille.

### c) Techniques relatives aux ARNm

#### *i) Extraction des ARN totaux*

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 30 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue dans 1,2 mL de Trizol<sup>®</sup> et incubée 5 min à 30°C. Ce dernier contient du phénol qui va précipiter les protéines, les lipides et d'autres débris cellulaires, et ainsi séparer les acides nucléiques du reste de l'extrait. Puis 300  $\mu$ L de chloroforme sont ajoutés. Après une incubation de 5 min à 30°C, les échantillons sont centrifugés pendant 15 min à 10 000 g à 4°C. Puis la phase aqueuse présente dans chaque échantillon, contenant l'ARN, est mélangée à de l'isopropanol (1 :1) et incubée 20 min à température ambiante afin de précipiter les acides nucléiques. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 min à 10 000 g à 4°C puis les culots sont lavés avec de l'éthanol à 70%. Après une deuxième centrifugation de 10 min à 10 000 g à 4°C, les culots sont séchés pendant 2 min sous vide, puis resuspendus dans 50  $\mu$ L d'eau milliQ stérile préalablement chauffée à 55°C. Les tubes sont incubés pendant 10 min à 55°C pour aider à la solubilisation des ARNs.

#### *ii) Traitement des ARN totaux avec une endonucléase*

Afin de s'assurer de la pureté des extractions d'ARN totaux qui pourraient être contaminés par de l'ADN génomique, les extraits sont traités avec une endonucléase (RQ1) qui dégrade l'ADN simple et double brin. 1  $\mu$ g d'ARN totaux est incubé 30 min à 37°C en présence de 1 U de RQ1 dans un volume final de 10  $\mu$ L de tampon 40 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, selon les recommandations du fabricant du kit « RQ1 RNase-Free DNase » (Promega). L'endonucléase est ensuite inactivée par l'ajout de 1  $\mu$ L d'une solution d'inhibiteurs contenant des sels et des chélateurs de cations (concentrations en EDTA et EGTA supérieures à 100 mM) et l'incubation des échantillons pendant 10 min à 65°C. Cette inactivation est requise pour le bon déroulement de la transcription inverse, ainsi que de la PCR par la suite.

iii) Transcription inverse des ARN messagers (ARNm)

Les ARNm ont la particularité d'acquérir au cours de leur maturation une queue polyadénylée (polyA) en leur extrémité 3'. Ainsi les ADNc sont amplifiés à partir de 500 ng d'ARN totaux traités par une endonucléase à l'aide d'une amorce polyT (15 à 18 nucléotides) qui s'hybride spécifiquement sur la queue polyA. Afin d'assurer une hybridation optimale de l'oligodT et de casser les structures tiges-boucles de l'ARNm, les ARN totaux sont chauffés à 70°C en présence de l'amorce pendant 5 min puis immédiatement refroidis dans la glace pendant 10 min. La polymérisation est réalisée à 42 °C pendant 1 h avec une reverse transcriptase (IM-PromII™) capable de rétrotranscrire l'ARNm en ADN. Le milieu final contient 0,5 mM d'oligodT, 0,5 mM de chaque dNTP (dATP, dTTP, dGTP et dCTP), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U de l'enzyme IM-PromII™ dans un volume final de 20 µL avec le tampon IM-PromII™ selon les recommandations du fabricant du kit « IM-PromII™ Reverse Transcription » (Promega). La reverse transcriptase est ensuite inactivée par incubation des échantillons pendant 15 min à 70°C.

iv) Quantification des ARNm par qPCR

La quantification des ARNm est réalisée par qPCR en utilisant des couples d'amorces spécifiques de la région 3'UTR (UnTranslated Region; partie d'ARN transcrite mais pas traduite par les ribosomes) des ARNm codés par les gènes d'intérêt. Ceci permet d'éviter la sous-estimation des niveaux de transcrits : en effet, la procession de la reverse transcriptase le long des ARNm n'est pas toujours uniforme. La quantification des ARNm d'intérêt s'est faite par rapport à l'expression d'un gène dit « constitutif » (*ACTIN2* d'*A. thaliana* (At3g18780)) ayant une expression relativement constante. Pour la qPCR, l'amplification est réalisée dans un volume final de 10 µL contenant 20 ng de produit de la transcription inverse, 1 mM d'oligonucléotide pour chaque couple d'amorce considéré et 5 µL de Master Mix 2X du kit « LightCycler® 480 SYBR Green I Master ». Ce Master Mix contient une ADN polymérase qui va amplifier l'ADN choisi, ainsi qu'un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce fortement à 530 nm lorsqu'il interagit avec l'ADN. La fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité d'ADN produit au cours de la PCR. Elle est enregistrée par l'appareil LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche Diagnostics) et les valeurs sont ensuite normalisées à celles réalisées avec le couple d'amorce spécifique de l'actine pour chaque échantillon, afin de pouvoir comparer les échantillons entre eux par la suite. Le programme utilisé pour la PCR est le suivant : 5 min de dénaturation à 95°C, 45 cycles (10s à 95°C, 15s à 60°C, 15s à 72°C), 15s à 72°C. A la fin de l'amplification, le milieu est chauffé lentement de

60°C à 95°C afin de dénaturer l'ADN amplifié et vérifier la présence d'un unique produit de PCR (ayant donc une seule température de dénaturation).

#### d) Techniques relatives aux clonages

##### i) Culture des bactéries

Pour une préculture de bactéries, une colonie bactérienne sélectionnée sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB-agar + antibiotique est repiquée avec un cure-dent pour ensemer 3 mL du même milieu liquide. Les bactéries sont ensuite incubées sous agitation à 200 rpm toute la nuit à 30°C pour *A. tumefaciens*, ou à 37°C pour *E. coli*. Cette culture est soit utilisée pour la purification de plasmides soit utilisée pour ensemer un plus grand volume de culture (pour produire des protéines recombinantes ou pour la transformation des plantes, par exemple).

Composition du milieu LB : 10 g.L<sup>-1</sup> Select peptone 140, 5 g.L<sup>-1</sup> extrait de levure Select, 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7,2. Pour le milieu LB-agar, 12 g.L<sup>-1</sup> d'agar sont ajoutés.

##### ii) Extraction d'ADN plasmidique

Une préculture de 3 mL de bactéries est centrifugée 5 min à 10 000 g à température ambiante. L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée avec le kit « Pure yield<sup>™</sup> plasmid miniprep system » (Promega) sur le culot bactérien selon le protocole du fournisseur. Brièvement, après resuspension du culot bactérien, l'ajout d'un tampon contenant une forte concentration de NaOH et de SDS provoque une lyse alcaline des bactéries. Puis le pH de l'extrait est neutralisé par l'ajout d'une solution tamponnée contenant de l'acétate, qui va précipiter l'ADN génomique. Après centrifugation à température ambiante pendant 3 min à 10 000g, le surnageant contenant l'ADN plasmidique est chargé sur une mini-colonne de résine qui va fixer les acides nucléiques. Après lavage de la colonne avec la solution du kit, le plasmide est élué avec un tampon 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 0,1 mM EDTA.

##### iii) Digestion enzymatique de l'ADN plasmidique

La digestion enzymatique de l'ADN plasmidique est réalisée avec au moins 1 U de chaque enzyme de restriction par µg d'ADN dans un tampon présentant au moins 75% de compatibilité pour les enzymes utilisées (selon le fournisseur, Promega). La digestion est réalisée à 37°C pendant 1 h.

iv) Purification de fragments d'ADN sur gel d'agarose

La partie du gel d'agarose contenant le fragment d'ADN à la taille attendue est excisée sous UV et l'ADN est extrait à l'aide du kit « Nucleospin® Extract II » selon le protocole du fournisseur (Macherey-Nagel).

v) Ligation d'un fragment d'ADN dans un plasmide

La ligation d'un fragment d'ADN ou insert dans un plasmide est réalisée avec 3 U d'ADN ligase du bactériophage T4 dans 20 µL de tampon 30 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, et 10 mM ATP à 4°C pendant la nuit. Le milieu réactionnel contient environ 20 ng de plasmide et 60 ng d'insert.

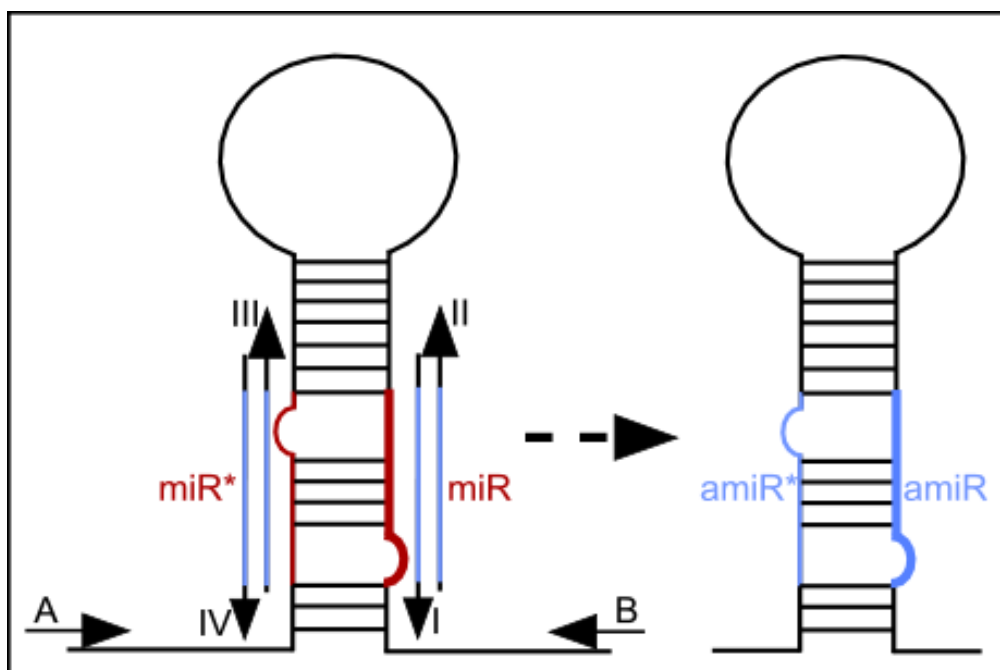
vi) Transformation de bactéries électrocompétentes et sélection des transformants

La transformation de bactéries se fait par électroporation dans une cuve de 1 mm de largeur contenant les bactéries et le plasmide à transformer. Préalablement, environ 20 ng de plasmide sont dessalés sur une membrane de cellulose (VS 0,025 µm, Millipore) flottant sur de l'eau milliQ stérile pendant 1 h, afin d'éviter la formation un arc électrique à cause des sels lors de la transformation. Un pulse électrique à 1,8 kV (électroporateur « *E. coli* pulser ») est appliqué afin de dépolariser la membrane des bactéries et permettre l'entrée du plasmide. Cette opération est directement suivie par l'ajout de 1 mL de SOC (LB + 3% glucose) puis une incubation pendant 1h30 à 30°C pour *A. tumefaciens*, ou l'ajout de 1 mL LB et une incubation de 30 min à 37°C pour *E. coli*, sous agitation. Cette incubation permet aux bactéries qui ont intégré le plasmide de produire la protéine codée par le gène de résistance du plasmide. Différents volumes de la solution de bactéries transformées (50, 100 et 200 µL) sont ensuite étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB + Agar (12 g.L<sup>-1</sup>) + antibiotique spécifique du gène de résistance du plasmide. Les boîtes sont incubées une nuit à 30°C pour *A. tumefaciens*, et à 37°C pour *E. coli* afin de sélectionner les bactéries transformées.

vii) Clonage des ADNc codants AtGOX1 ou ZmGO1 dans pET28a

L'ORF de l'ADNc pleine longueur codant ZmGO1 a été commandé à Arizona Genomics Institute (clone ZM\_BFc0135O12).

L'ADNc codant AtGOX1 est obtenu par transcription inverse d'ARN totaux extraits des feuilles de rosettes de plantes Col-0. Une PCR est réalisée avec la Taq polymérase et le couple



PCRs	amorce sens	amorce antisens	matrice
(a)	amiRNA-A	amiRNA-GO-IV	pRS300 <i>mir319a</i>
(b)	amiRNA-GO-III	amiRNA-GO-II	pRS300 <i>mir319a</i>
(c)	amiRNA-GO-I	amiRNA-B	pRS300 <i>mir319a</i>
(d)	amiRNA-A	amiRNA-B	(a)+(b)+(c)

**Figure 18.** Stratégie de remplacement de la séquence du micro-ARN artificiel dans le plasmide pRS300 selon le protocole Schwab et al. (2006). Le tableau donne les différentes PCRs qui ont été réalisées.



d'amorces AtGOX1-f et AtGOX1-r afin d'amplifier le fragment d'intérêt (ORF). Le produit de la PCR est purifié à partir d'un gel d'agarose et il est cloné dans le plasmide pGEM-T Easy<sup>®</sup> puis séquencé.

Pour cloner les ORF des ADNc de AtGOX1 et de ZmGO1 dans le vecteur pET28a, des sites de restriction (*Xho*I à l'extrémité 5' et *Nhe*I à l'extrémité 3') sont ajoutés par PCR en utilisant la Taq polymérase et les couples d'amorces AtGOX1-*Xho*I+AtGOX1-*Nhe*I et ZmGO1-*Xho*I+ZmGO1-*Nhe*I pour AtGOX1 et ZmGO1 respectivement. Les produits de PCR sont purifiés à partir d'un gel d'agarose puis ils sont clonés dans le plasmide pGEM-T Easy<sup>®</sup> et séquencés. Les plasmides obtenus et le vecteur pET28a sont digérés par les enzymes de restriction *Xho*I et *Nhe*I. Les produits de digestion sont purifiés sur gel d'agarose (pET28a, ADNc de AtGOX1, ADNc de ZmGO1) et ligués. Ces ligations servent à la transformation de bactéries DH5 $\alpha$ , puis les transformants sont sélectionnés par leur résistance à la kanamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>). Après une préculture des colonies sélectionnées, leurs ADN plasmidiques sont extraits et contrôlés par des digestions analytiques. Les plasmides pET28a-AtGOX1 et pET28a-ZmGO1 sont utilisés pour transformer des bactéries BL21(DE3). Les transformants sont alors sélectionnés par leur résistance à la kanamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>) et utilisés pour la production des protéines recombinantes.

viii) Clonage du gène *amiRGOX1/2* dans le plasmide *pAlligator2* par le système Gateway<sup>®</sup>

Ce clonage a été réalisé par Mathieu Jossier.

Le fragment *amiRGOX1/2* est produit à partir du *mir319a* contenu dans le plasmide pRS300, en remplaçant une partie du *mir319a* par la séquence « TAACATACGAA GCTAAGCCAT ». Ce remplacement est réalisé par 4 PCR distinctes avec les amorces *amiRNA-GO-I*, *II*, *III*, *IV*, *amiRNA-A* et *B* (voir la séquence dans la section amorce I.4) b) ) selon le protocole de Schwab et al. (2006) (voir Figure 18). Le produit final (fragment *amiRGOX1/2*) est cloné dans le plasmide pGEM-T Easy<sup>®</sup> et la séquence d'*amiRGOX1/2* est vérifiée. Puis le fragment *amiRGOX1/2* est sous-cloné dans le plasmide pENTR2B en utilisant les sites de restriction *Not*I et *Eco*RI. Ensuite, il est transféré au plasmide *pAlligator2* par recombinaison des sites *attL* de pENTR2B-*amiRGOX1/2* avec les sites *attR* de *pAlligator2*, sous l'action de la LR Clonase pendant une nuit à 25°C. Le milieu réactionnel final contient 50 fmoles du *pAlligator2* et 50 fmoles du pENTR2B-*amiRGOX1/2*, 2  $\mu$ L de mix LR clonase (Gateway<sup>®</sup>) et du tampon TE (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA) pour un volume final de 10  $\mu$ L. Puis les enzymes sont inactivées pendant 10 min à 37°C après l'ajout de 1  $\mu$ L

de protéinase K ( $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Des bactéries DH5 $\alpha$  sont transformées avec  $1 \mu\text{L}$  du mélange, et les transformants sont sélectionnés par l'absence du gène suicide *ccdB* dans le plasmide (éliminé lors de la recombinaison) et leur résistance à la spectinomycine.

ix) Clonage du promoteur du gène *SHMT1* d'*A. thaliana* dans le plasmide *pK7GW*

Ce clonage a été réalisé par Nathalie Glab et Céline Oury.

Un fragment de 1 kb de la région promotrice du gène *SHMT1* est amplifié par PCR avec l'ADN polymérase *PfuI* selon le protocole du fournisseur (Promega) à partir d'ADN génomique extraits de feuilles d'*Arabidopsis* selon Dellaporta *et al.*, (1983 ; voir II. B) 2) a) ). Les amorces promSHMHindIII-f et promSHMSpeI-r permettent de rajouter les sites de restriction *HindIII* et *SpeI* aux extrémités 5' et 3', respectivement. Après migration du produit de la PCR sur un gel d'agarose, l'ADN de 1 kbp est excisé et purifié. Un cycle de PCR en présence d'ATP et de *Taq* polymérase permet de rajouter une adénosine sortante aux extrémités 5' du fragment d'ADN qui est alors cloné dans le pGEM-T Easy<sup>®</sup> (150 ng d'insert, 50 ng du vecteur pGEM-T Easy). Après validation de la séquence, la région promotrice est ensuite sous-clonée dans le plasmide pK7WG en amont de la région permettant la recombinaison, en utilisant les sites de restriction *HindIII* et *SpeI*.

x) Clonage de l'ADNc codant *ZmGO1* dans le plasmide *pK7WG-proSHMT1* par le système Gateway<sup>®</sup>

Ce clonage avec le système Gateway<sup>®</sup> a été réalisé par Nathalie Glab et Céline Oury.

Les sites *attB* sont rajoutés aux extrémités de l'ADNc codant *ZmGO1* par 2 PCR distinctes en utilisant le pET28a-*ZmGO1* et les couples d'amorces GW-*ZmGO1*-f et GW-*ZmGO1*-r (10 cycles) et Gateway-f et Gateway-r (30 cycles sur  $10 \mu\text{L}$  du produit de la PCR précédente) et l'ADN polymérase *PfuI* selon le protocole du fournisseur (Promega). Le produit final est introduit dans le pDONR207 par recombinaison *via* les sites *attB* du produit PCR et les sites *attP* du pDONR207 (générant les sites *attL*) sous l'action de la BP Clonase pendant une nuit à 25°C. Le milieu réactionnel final contient 50 fmoles du produit PCR et 50 fmoles du pDONR207,  $2 \mu\text{L}$  de mix BP Clonase (Gateway<sup>®</sup>) et du tampon TE (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA) pour un volume final de  $10 \mu\text{L}$ . Puis les enzymes sont inactivées pendant 10 min à 37°C après l'ajout de  $1 \mu\text{L}$  de protéinase K ( $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Des bactéries DH5 $\alpha$  sensibles au gène suicide *ccdB* (contenu dans pDONR207 initialement) sont transformées avec  $1 \mu\text{L}$  du mélange de réaction Gateway<sup>®</sup>, et les transformants sont sélectionnés par

l'absence du gène suicide *ccdB* dans le plasmide, ainsi que leur résistance à la gentamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>). L'ADN plasmidique des transformants est extrait, puis l'ADNc de *ZmGO1* est transféré dans le vecteur pK7WG-*proSHMT1* par recombinaison des sites *attL* nouvellement formés dans le pDONR207 avec les sites *attR* du pK7WG-*proSHMT1* (réaction Gateway<sup>®</sup> avec la LR Clonase).

#### e) Techniques de transformation d'*A. thaliana* par *A. tumefaciens* et de sélection de lignées homozygotes

##### i) Transformation d'*A. thaliana* par « floral dip »

La transformation d'*A. thaliana* par la technique de « floral dip » est réalisée selon Clough et Bent (1998). 300 mL de milieu LB additionnés de rifampicine (50 mg.L<sup>-1</sup>) et de gentamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>) sontensemencés par 3 mL d'une préculture d'*A. tumefaciens* transformée soit par le plasmide *proSHMT1::pK7WG-ZmGO1* pour la transformation de la lignée *amiRgox1/2* (ajout de spectinomycine dans le milieu à 100 mg.L<sup>-1</sup>) soit par le plasmide pAlligator2-*amiRGOX1/2* pour la transformation de Col-0 (ajout de kanamycine dans le milieu à 50 mg.L<sup>-1</sup>). Après 24 h d'incubation à 30 °C, les agrobactéries sont centrifugées 20 min à 5500 g à température ambiante. Le culot bactérien est resuspendu dans 150 mL d'une solution d'infiltration (saccharose 5% (m/v), silwet 5% (v/v)). Les inflorescences d'*Arabidopsis* cultivées en jours longs en conditions de fort CO<sub>2</sub> pour la lignée *amiRgox1/2* (pour la complémentation avec *ZmGO1*) ou en air pour la lignée sauvage Col-0 (pour la construction de la lignée *amiRgox1/2*), sont immergées dans la suspension bactérienne pendant 3 min. Les plantes infectées sont placées 2 jours sous une cloche (conditions humides) afin de favoriser le développement des agrobactéries puis remises en culture jusqu'à la récolte des graines qui sont alors conservées à 10°C.

##### ii) Sélection des plantes *amiRgox1/2* et *compl* homozygotes avec une insertion

La sélection des plantes homozygotes pour la lignée *amiRgox1/2* est réalisée avec une loupe binoculaire à fluorescence LED possédant un filtre GFP (Leica) avec une fenêtre d'excitation de 450-490 nm et une capture d'émission de 500-550 nm. En effet, l'ADN-T inséré dans ces plantes contient un gène exprimant spécifiquement la GFP dans l'enveloppe de la graine (tégument). La sélection des plantes homozygotes pour la lignée *compl* est réalisée *in vitro* dans l'air sur un milieu ½ MS + agar + 3% glucose additionné de kanamycine (50 mg.L<sup>-1</sup>) en jours courts.

Dans un premier temps, des plantes hétérozygotes (transformants primaires, T1) pour ces lignées ayant au moins une insertion sont sélectionnées par fluorescence (*amiRgox1/2*) ou résistance à la kanamycine (*compl*). Leurs graines sont récoltées, et la ségrégation de la descendance des plantes est analysée afin d'écarter les lignées présentant plus d'une insertion. Selon les lois de l'hérédité de Mendel, si les plantes hétérozygotes pour l'insertion contiennent un seul ADN-T dans leur génome,  $\frac{1}{4}$  de plantes sauvages,  $\frac{1}{4}$  de plantes homozygotes pour l'insertion et  $\frac{1}{2}$  de plantes hétérozygotes pour l'insertion sont attendus dans leur descendance. Donc un quart de plantes sensibles à l'antibiotique de sélection (*compl*) ou non-fluorescente (*amiRgox1/2*) est attendu. Les plantes sélectionnées comme résistantes/fluorescentes sont ensuite cultivées en jours longs et amenées au stade « graine ». Chaque lot de graines correspondant à une plante T2 est récolté séparément. Puis la ségrégation de leur descendance est analysée : si la plante mère est homozygote pour l'insertion, alors toutes ses graines sont fluorescentes (*amiRGOX1/2*) ou résistantes à la kanamycine (*compl*). Les lots de graines homozygotes pour une seule insertion pour ces lignées sont conservés pour être utilisés lors de cette thèse.

### 3) Techniques de biochimie des protéines

#### a) Production et purification de protéines recombinantes avec une étiquette histidine

Les GOX recombinantes sont produites dans *E. coli* avec un système d'induction à l'IPTG (opéron lactose). Elles sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité grâce à leur étiquette histidine en position N-terminale. Des bactéries BL21(DE3) contenant les plasmides pET28a-AtGOX1, pET28a-AtGOX2 ou pET28a-ZmGO1 sont mises en culture sur la nuit dans 3 mL de milieu LB liquide + kanamycine ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation à 200 rpm. Le lendemain, ces 3 mL de culture sont dilués dans 200 mL de milieu LB liquide supplémenté de kanamycine ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), et incubés à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation à 200 rpm. Lorsque la DO à 600 nm a atteint environ 0,4, l'expression de la protéine recombinante est induite par ajout de 1 mM d'IPTG dans le milieu et les bactéries sont incubées pendant 20 h à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation à 200 rpm. Après une étape de centrifugation (10 min à 1300 g à  $4^\circ\text{C}$ ), les culots de bactéries sont resuspendus dans 3 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M NaCl, 10% glycérol (v/v), 10 mM imidazole, 100  $\mu\text{M}$  FMN) contenant 1 tablette de cocktail d'anti-protéases sans EDTA (pour 50 mL de tampon de lyse) (Roche). Après 3 passages à la presse de French à 600 Pa, le lysat est centrifugé à 15 500 g pendant 30 min à  $4^\circ\text{C}$ . Le

surnageant, contenant les protéines solubles, est dilué dans le tampon de lyse pour donner 15 mL de volume final puis il est incubé à 4°C sur une roue (à 8 rpm) pendant 1 h en présence de 1 mL de résine His-Select, (Sigma-Aldrich ; préalablement lavée 2 fois avec 50 mL de tampon de lyse) afin de fixer les protéines ayant une étiquette histidine sur la résine. Puis la résine est placée dans une seringue avec de la laine de verre au fond pour former une colonne d'affinité. Ensuite, la résine est lavée avec 50 mL de tampon de lavage (tampon de lyse sans antiprotéases additionné de 20 mM imidazole). Les protéines avec une étiquette histidine sont ensuite éluées en 5 fractions de 0,5 mL de tampon d'élution (tampon de lavage avec 250 mM imidazole). Cette étape sert à définir dans quelles fractions se trouve la protéine recombinante ainsi que le degré de pureté de la purification (analyse des extraits protéiques par gel SDS-PAGE). La première fraction ne contenant pas de protéines, elle est jetée. Les autres fractions sont mélangées puis placées sur une colonne PD-10 (GE, Healthcare), préalablement équilibrée avec 25 mL de tampon de dessalage (50 mM Tris-HCl, pH 8, 20% glycérol, 100  $\mu$ M FMN), afin d'être dessalées. Les protéines sont éluées en 7 fractions de 0,5 mL de tampon de dessalage, afin de savoir dans quelles fractions se trouvent la protéine (analyse des extraits protéiques par gel SDS-PAGE). La première fraction est écartée car elle ne contient pas de protéines. Les autres fractions sont mélangées. Lors de chaque production de protéines recombinantes, les extraits purifiés sont systématiquement analysés par gel SDS-PAGE pour contrôler la purification de la GOX. Pour confirmer que la protéine majoritaire d'environ 40 kDa correspondait à la GOX, la bande de protéine a été découpée d'un gel SDS-PAGE puis analysée par spectrométrie de masse à la plateforme PAPPSO du Moulon.

### **b) Séparation de protéines sur gel SDS-PAGE**

Les extraits protéiques solubles issus de feuilles ou de la purification de protéines recombinantes ont été séparés par électrophorèse monodimensionnelle dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) selon Laemmli, (1970). Ce gel est composé de deux parties : un gel de focalisation qui va uniformiser la répartition des protéines dans le gel avant leur séparation, et un gel de séparation qui va séparer les protéines selon leur masse moléculaire. Le gel de focalisation est composé de : acrylamide 4% (m/v), 125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1% (m/v), ammonium persulfate 0,1% (m/v), TEMED 0,1% (v/v). Le gel de séparation est composé de : acrylamide 10% (m/v), 375 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1% (m/v), ammonium persulfate 0,1% (m/v), TEMED 0,1% (v/v). Les extraits protéiques (entre 5 et 30  $\mu$ g suivant les expériences) sont dénaturés à 95°C pendant 5 min dans un tampon de Laemmli : 62 mM Tris-HCl, SDS 0,2% (m/v), glycérol 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol

5% (v/v) puis ils sont chargés dans les puits du gel. L'électrophorèse se déroule pendant 2 h dans un tampon de migration : 25 mM Tris, 122 mM glycine, SDS 0,1% (m/v). La révélation des protéines est réalisée par leur coloration pendant la nuit avec un mélange de bleu de Coomassie 0,2% (m/v), d'éthanol 40% (v/v), d'acide acétique 10% (v/v)) puis une étape de décoloration de 2 h avec un mélange d'éthanol 40% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v).

### c) Western-Blot

Suite à une séparation sur gel SDS-PAGE, les protéines sont directement transférées sur une membrane de nitrocellulose par transfert horizontal à 100 V pendant 1 h30 dans le tampon de transfert : 25 mM Tris, 192 mM glycine, SDS 0,04% (m/v), éthanol 20% (v/v). La membrane de nitrocellulose est incubée avec 50 mL de LTBST (20 mM Tris, 220 mM NaCl, Tween 0,1% (v/v), lait en poudre 5% (m/v)) pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Puis les premiers anticorps de lapin dirigés contre un peptide commun aux GOX1/2/3 d'*A.thaliana* (Anticorps AS14 2772, Agrisera) sont dilués au 1 000<sup>ème</sup> dans du LTBST et ils sont incubés avec la membrane à 4°C sous faible agitation pendant la nuit. Le lendemain, la membrane est lavée 3 fois pendant 10 min avec 50 mL de LTBST. Puis les anticorps secondaires couplés à la HRP (« HorseRadish Peroxidase ») et dirigés contre les protéines de lapin, dilués au 50 000<sup>ème</sup> dans du LTBST, sont incubés pendant 1 h avec la membrane à température ambiante sous agitation. Ensuite, la membrane est lavée 2 fois pendant 10 min avec 50 mL de LTBST et une fois pendant 10 min avec 50 mL de TBST (LTBST sans lait). La GOX a été révélée par la réaction d'ECL (« enhanced chemoluminescence ») avec les solutions du kit « Chemoluminescent peroxidase substrate-3 » (Sigma-Aldrich) et une autoradiographie (temps d'exposition 5 min).

### d) Mesures d'activités enzymatiques

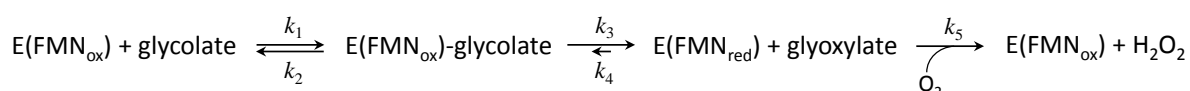
#### i) Mesure de l'activité des GOX recombinantes

L'activité enzymatique des GOX recombinantes est mesurée par spectrophotométrie en utilisant une réaction couplée: en présence de glycolate et d'oxygène, l'activité « GOX » libère d' $\text{H}_2\text{O}_2$  qui est réduit par la HRP en utilisant de l'*o*-dianisidine comme accepteur d'électron (voir Stenberg et Lindqvist, 1996). La formation du cation *o*-dianisidine est suivie à 30°C avec un spectrophotomètre réglé à 440 nm dans 1 mL de milieu réactionnel contenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 400  $\mu\text{M}$  *o*-dianisidine, 1 U de HRP, entre 50  $\mu\text{M}$  et 10 mM de glycolate ou de 2,2-*d*<sub>2</sub>-glycolate et 4  $\mu\text{g}$  de protéines purifiées. Pour la mesure des activités dans D<sub>2</sub>O, tous les réactifs sont dissous dans le tampon de la réaction préparé dans D<sub>2</sub>O et

ajusté à pH 8 (pD = pH - 0,4) avec une solution de DCl (35% (v/v)). De cette façon, le milieu réactionnel final contient au moins 95% de D<sub>2</sub>O. Comme l'activité de la HRP est diminuée dans D<sub>2</sub>O, 10 U de HRP sont utilisées pour ces mesures afin de s'assurer que la conversion de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soit toujours non-limitante dans ces conditions.

### ii) Calcul des paramètres cinétiques des GOX recombinantes

Le mécanisme réactionnel de la GOX décrit dans la littérature est le suivant (Macheroux *et al.*, 1991) :



Avec  $k$  représentant les constantes cinétiques associées aux étapes élémentaires de la réaction, E, l'enzyme GOX et FMN, son cofacteur.

La vitesse  $v$  de réaction de la GOX, en présence de ses deux substrats (glycolate et oxygène) est donnée par la relation suivante (Macheroux *et al.*, 1991) :

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{S} + \frac{K_o}{O}} \quad \text{avec} \quad K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad \text{et} \quad K_o = \frac{k_3}{k_5}$$

Où  $S$  = la concentration en glycolate,  $O$  = la concentration en oxygène,  $V_{\max} = k_3 \cdot [E_0]$  pour une concentration en glycolate saturante ( $[E_0]$  = concentration en enzymes au début de la réaction),  $K_m$  = constante d'affinité de l'enzyme pour le glycolate et  $K_o$  = constante d'affinité de l'enzyme pour l'oxygène

Pour calculer les paramètres cinétiques ( $V_{\max}$  et  $K_m$ ), la réaction est mesurée en présence de différentes concentrations en glycolate sans modifier la concentration en O<sub>2</sub> (à cause des difficultés techniques). Ainsi, deux types de paramètres cinétiques sont calculés :

- $V_{\max}^{\text{app}}$  et  $K_m^{\text{app}}$ , correspondant à l'hypothèse d'une concentration en oxygène non-limitante pour la réaction. Dans ce cas, l'expression de la vitesse de la réaction s'apparente à celle de Michaëlis-Menten pour un seul substrat, donné par la relation suivante :

$$v = \frac{V_{\max}^{\text{app}} \cdot S}{K_m^{\text{app}} + S}$$



Les paramètres  $V_{\max}^{\text{app}}$  et  $K_m^{\text{app}}$  sont calculés à partir des données expérimentales et de l'équation ci-dessus, en utilisant le logiciel « Kinetic Enzyme Wizard » de Sigma-Plot (Systat Software Inc.).

- $V_{\max}$ ,  $K_m$  et  $K_o$ , correspondant à l'hypothèse d'une concentration en oxygène limitante pour la réaction. Dans ce cas, la forme linéaire de l'expression de la vitesse de la réaction a été utilisée :

$$\ln v = \ln V_{\max} + \ln \left( 1 + \frac{K_m}{S} + \frac{K_o}{O} \right)$$

Les paramètres  $K_m$  et  $K_o$  sont calculés à partir des données expérimentales avec l'équation ci-dessus en fixant une valeur pour  $V_{\max}$ , à l'aide du logiciel « Kinetic Enzyme Wizard » de Sigma-Plot. Le calcul est répété (pour chaque série de données) en modifiant la valeur de  $V_{\max}$ , pour déterminer les paramètres qui permettaient la meilleure minimisation de la somme des moindres carrées. Le calcul simultané des paramètres  $V_{\max}$ ,  $K_m$  et  $K_o$  selon cette équation en utilisant des optimisations numériques avec le solveur d'Excel (Microsoft) a donné des valeurs similaires (1000 itérations).

### iii) Calcul des effets isotopiques H/D des protéines recombinantes

L'effet isotopique cinétique pour une réaction unidirectionnelle ayant un unique substrat peut être décrit comme étant égal au rapport de la vitesse de réaction avec l'isotope léger sur celle avec l'isotope lourd. Dans notre cas, afin de déterminer l'effet du deutérium sur la vitesse de la réaction, il est supposé que le glycolate marqué au deutérium et non-marqué rentrent en compétition pour la réaction, de même lorsque la réaction se déroule dans un solvant ordinaire ou deutéré. En utilisant l'équation de Michaëlis-Menten décrivant la vitesse de réaction d'une enzyme en présence d'un inhibiteur, on peut calculer l'effet isotopique  $\alpha$  pour le deutérium ( $^D\alpha$ ) :

$$^D\alpha = \frac{{}^H V_{\max} \cdot {}^D K_m \cdot {}^H S}{{}^D V_{\max} \cdot {}^H K_m \cdot {}^D S}$$

Or, au début de la réaction, la quantité de produit formé est négligeable, et donc la quantité de substrat ne varie quasiment pas. Dès lors, l'expression de  $^D\alpha$  peut être simplifiée en :

$$^D\alpha = \frac{{}^H V_{\max} \cdot {}^D K_m}{{}^D V_{\max} \cdot {}^H K_m}$$

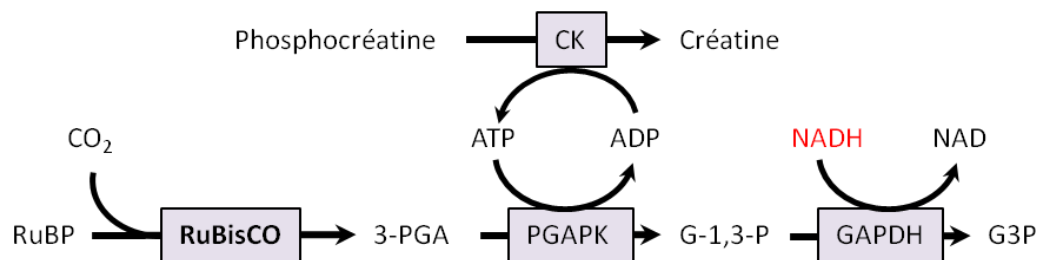
Cette expression est utilisée pour le calcul des effets isotopiques cinétiques (Kinetic Isotope Effect ; KIE) apparents et réels du glycolate deutéré ou de l'eau lourde sur la réaction enzymatique de la GOX. L'effet isotopique apparent est calculé à partir des valeurs de  $V_{\max}^{\text{app}}$  et  $K_m^{\text{app}}$  tandis que l'effet réel est calculé à partir des valeurs de  $V_{\max}$ ,  $K_m$  et  $K_o$ .

#### iv) Activité de la GOX de feuilles d'*A. thaliana*

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à 4°C dans 650  $\mu\text{L}$  de 50 mM Tris-HCl, pH 8 en présence d'antiprotéases (1 tablette de cocktail d'anti-protéases sans EDTA (Roche) dans 50mL de tampon). Après 10 min de centrifugation à 4°C à 10 000 g, 600  $\mu\text{L}$  du surnageant sont récupérés puis centrifugés comme précédemment. Ensuite, 500  $\mu\text{L}$  du surnageant sont déssalés par gel filtration (NAP-5, préalablement équilibrée avec 10 mL de tampon 50 mM Tris-HCl, pH 8). Les protéines sont éluées avec 1 mL du même tampon. L'activité GOX est mesurée par spectrophotométrie (comme décrit pour les protéines recombinantes, avec 10 mM de glycolate) en utilisant 200  $\mu\text{L}$  de l'extrait protéique foliaire.

#### v) Activité de la GGT de feuilles d'*A. thaliana*

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à 4°C dans 650  $\mu\text{L}$  de 100 mM Tris-HCl, pH 7,3 contenant des anti-protéases (1 tablette de cocktail d'anti-protéases sans EDTA (Roche) dans 50 mL de tampon). Après 10 min de centrifugation à 4°C à 10 000 g, 600  $\mu\text{L}$  du surnageant sont récupérés puis recentrifugés de la même façon. 500  $\mu\text{L}$  du surnageant sont alors chargés sur une colonne NAP-5, préalablement équilibrée avec 10 mL de 100 mM Tris-HCl, pH 7,3, pour être déssalés. La colonne est éluée avec 1 mL du même tampon. L'activité GGT est mesurée à 30°C en suivant le protocole décrit dans Igarashi *et al.*, (2003). En présence de glutamate et de glyoxylate, l'activité « GGT » produit du 2-OG. La glutamate déshydrogénase (GluDH), en utilisant le 2-OG, du NADH et du  $\text{NH}_4$ , catalyse la formation de glutamate. C'est l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  qui est suivie par spectrophotométrie à 340 nm. Le milieu réactionnel final contient 100 mM Tris-HCl, pH 7,3, 20 mM glutamate, 1 mM glyoxylate, 83 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,3 U GDH, 180  $\mu\text{M}$  NADH et 200  $\mu\text{L}$  de l'extrait protéique foliaire.



**Figure 19.** Système couplé d'enzymes pour la mesure de l'activité carboxylase de la RuBisCO *in vitro*.  
 RuBP, ribulose-1,5-biphosphate; RuBisCO, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; PGAPK, 3-PGA phosphokinase ; CK, créatine kinase ; G-1,3-P, glycérate-1,3-diphosphate ; GAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ; G3P, glycéraldéhyde-3-phosphate

*vi) Activité carboxylase de la RuBisCO de feuilles d'A. thaliana*

200 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés dans un mortier préalablement refroidi à l'azote. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à 4°C dans 1 mL de tampon contenant 100 mM Bicine-HCl, pH 8 (préalablement dégazé sous vide pendant 30 min), 20% glycérol, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 0,2% polyvinylpyrrolidone, et des antiprotéases (1 tablette de cocktail d'antiprotéases sans EDTA (Roche) dans 50 mL de tampon). Après une étape de centrifugation rapide (10 s à 10 000 g à 4°C), le surnageant est conservé à 4°C durant le remplissage de la microplaque. L'activité carboxylase de la RuBisCO est mesurée par un système couplé d'enzymes (Ward et Keys, 1989) selon la figure 19. C'est l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup> qui est suivie par spectrophotométrie à 340 nm à 25°C. Le milieu réactionnel final contient 100 mM Bicine, pH 8, 5 U PGAPK, 5 U GAPDH, 5 U CK, 5 mM phosphocréatine, 5 mM ATP, 200 µM NADH, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 666 µM RuBP et 10 µL de l'extrait protéique de plantes. Pour la mesure de l'activité initiale, le NaHCO<sub>3</sub> est ajouté en dernier avant de commencer la mesure. Pour l'activité totale, l'extrait protéique est d'abord incubé 15 min avec 20 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM NaHCO<sub>3</sub> dans le tampon de la réaction, puis les autres composants de la réaction (enzymes, ATP, RuBP, NADH) sont ajoutés, en terminant par le RuBP avant de commencer la mesure d'activité. Un blanc est réalisé pour chaque extrait. Cette activation de la RuBisCO (activité totale) permet la fixation précoce d'un cation divalent (Mg<sup>2+</sup>) et d'un CO<sub>2</sub> sur le site actif de la RuBisCO, qui change la conformation du site actif (forme ouverte ternaire activée) et facilite la fixation du RuBP par la suite (Taylor et Andersson, 1997). L'activité totale est donc mesurée après cette activation, et la mesure de l'activité initiale sans cette activation. L'état d'activation de la RuBisCO correspond au ratio activité initiale/activité totale.

**e) Quantification des protéines solubles**

La quantité de protéines est mesurée selon la méthode de Bradford, (1976) avec le réactif « BioRad Assay » par spectrophotométrie à 595 nm. 20 µL d'un extrait protéique foliaire ou 5 µL d'un extrait de protéine recombinante purifiée, sont mélangés à 980 µL ou 995 µL de réactif Bradford Reagent (Sigma), respectivement. Après 5 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre un blanc (réactif sans protéines). La quantité de protéines est ensuite calculée par rapport à une courbe de calibration établie en utilisant l'albumine de sérum bovin (BSA).

#### 4) Analyse des échanges gazeux et des paramètres de fluorescence chlorophyllienne

##### a) Mesure des échanges gazeux de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O

Les échanges gazeux sont réalisés en système ouvert, c'est-à-dire que l'air est constamment renouvelé au niveau de la feuille. Pour l'ensemble des mesures, nous avons utilisé un appareil portable de mesure d'échanges gazeux : le LiCOR 6400-XT (LI-COR; revendeur en France : Eurosep). Il est composé d'une console de contrôle reliée à un appareil de mesure. Le principe de fonctionnement de cet appareil repose sur l'utilisation d'un IRGA (« Infra Red Gas Analyser ») qui permet d'analyser en permanence les quantités de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O dans l'air (la liaison <sup>12</sup>C-<sup>16</sup>O et la liaison <sup>1</sup>H-<sup>16</sup>O absorbent la lumière infra-rouge à des longueurs d'ondes différentes). L'air entrant est analysé en permanence dans l'appareil de mesure (contenant un bloc IRGA + la chambre d'échanges gazeux) *via* le canal de référence, ainsi que l'air ambiant dans la chambre *via* le canal d'échantillon. Afin de contrôler la quantité de CO<sub>2</sub> disponible, l'air entrant dans la console passe d'abord par un piège à CO<sub>2</sub> composé de chaux sodée. Ce dernier permet d'obtenir un air contenant tous les autres gaz de l'atmosphère dans les mêmes concentrations mais sans CO<sub>2</sub>, ainsi qu'une humidité supérieure à celle de l'air (en effet, la chaux sodée fraîchement utilisée est toujours légèrement humide). La quantité de CO<sub>2</sub> souhaitée est ensuite ajustée selon la consigne donnée par la console *via* une électrovanne reliée à une bouteille de CO<sub>2</sub>. La chambre d'échanges gazeux utilisée (6400-40 LCF, Leaf Fluorescence Chamber) permet de pincer une feuille d'*A. thaliana* possédant une surface foliaire circulaire d'au moins 2 cm<sup>2</sup> (correspondant à des feuilles de plantes âgées d'environ 6-7 semaines en jours courts).

L'assimilation photosynthétique nette de CO<sub>2</sub> (A<sub>n</sub>) et la transpiration d'eau (T<sub>r</sub>) sont calculées directement par l'appareil, qui utilise les formules suivantes :

$$A_n = \left( \frac{CO_{2R} - CO_{2S}}{VS} \right) D \qquad T_r = \left( \frac{H_2OR - H_2OS}{VS} \right) D$$

Où V (L.mol<sup>-1</sup>) est le volume molaire de l'air à la température mesurée et à la pression considérée, S (m<sup>2</sup>) est la surface de la feuille et D (L.s<sup>-1</sup>) est le débit de l'air entrant dans la chambre. CO<sub>2</sub>R et H<sub>2</sub>OR correspondent à la quantité de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O qui rentrent dans la chambre d'échanges gazeux tandis que CO<sub>2</sub>S et H<sub>2</sub>OS correspondent à la quantité de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>O qui sortent de la chambre d'échanges gazeux (mol.L<sup>-1</sup>).

Les paramètres issus des échanges gazeux sont mesurés à 200  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (90% de lumière rouge (pic d'absorption maximum à 635 nm), 10% de lumière bleu (pic d'absorption maximum à 465 nm), source LED), avec un VPD (« Vapor Pressure Deficit ») égal à 1 (dans notre cas, il y a environ 65% d'humidité, avec une température foliaire d'environ 21°C pour un air extérieur à 25°C).

Dans le cadre de ces travaux, certains mutants photorespiratoires montrent une baisse de l'assimilation nette de  $\text{CO}_2$  après un transfert de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air, cependant cette baisse devient relativement stable après 1 h de transfert. Ainsi, pour la réalisation de courbes de réponse (lumière ou  $\text{CO}_2$ ), les plantes sont transférées 1 h dans l'air à la lumière au préalable. Ensuite, les courbes de réponse à la lumière sont effectuées dans les conditions décrites précédemment en utilisant différents paliers de lumière: 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec 6 à 10 min de stabilisation entre chaque palier avant d'enregistrer la mesure (à 380  $\mu\text{L.L}^{-1}$   $\text{CO}_2$ ). Les courbes de réponse au  $\text{CO}_2$  sont aussi effectuées dans les conditions décrites précédemment (à 200  $\mu\text{mol}$  de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), en utilisant différentes concentrations en  $\text{CO}_2$ : 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800  $\mu\text{L.L}^{-1}$  suivant les expériences et le génotype des plantes, avec 8 à 15 min de stabilisation entre chaque palier avant d'enregistrer la mesure.

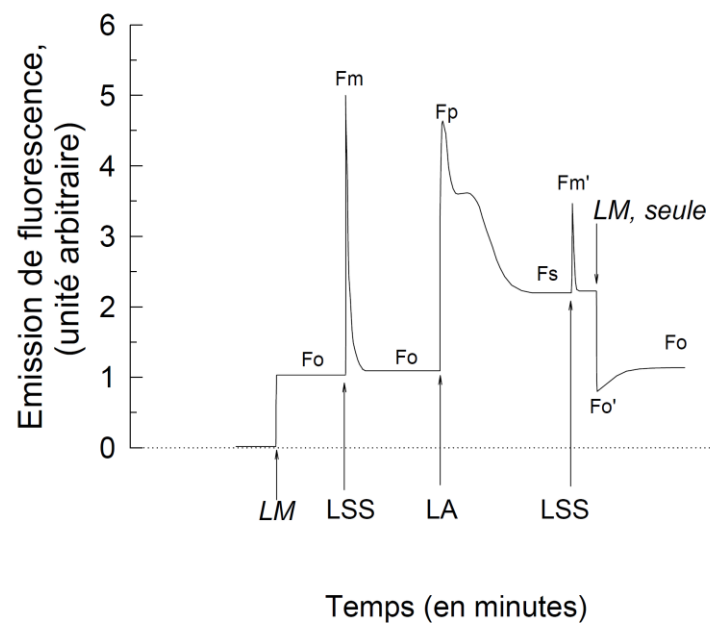
La mesure du point de compensation de  $\text{CO}_2$  à la lumière, ( $\Gamma$ ) définissant la concentration de  $\text{CO}_2$  nécessaire à l'activité carboxylase de la RuBisCO pour compenser les pertes photorespiratoires (*via* l'activité de la GDC) et respiratoires (*via* l'activité d'enzymes du cycle de Krebs) est réalisée à partir des courbes de réponse au  $\text{CO}_2$ . L'assimilation nette de  $\text{CO}_2$  au cours du temps chez une plante  $\text{C}_3$  peut être modélisée par la relation suivante (Farquhar *et al.*, 1980) :

$$A_n = v_c - 0.5v_o - R_{day}$$

$v_c$  = vitesse de carboxylation de la RuBisCO  
 $v_o$  = vitesse d'oxygénation de la RuBisCO  
 $R_{day}$  = respiration à la lumière

Il apparaît qu' $A_n = 0$  lorsque les pertes de  $\text{CO}_2$  sont compensées par l'activité carboxylase de la RuBisCO. Le paramètre  $\Gamma$  est obtenu par la résolution graphique de l'intersection de la partie linéaire de la courbe de réponse au  $\text{CO}_2$  avec l'axe des abscisses.

La respiration à l'obscurité est mesurée après incubation des plantes 30 min à l'obscurité.



**Figure 20.** Séquence de mesure des paramètres de fluorescence chlorophyllienne. LM, Lumière modulée ; LSS, Lumière sursaturante ; LA, lumière actinique



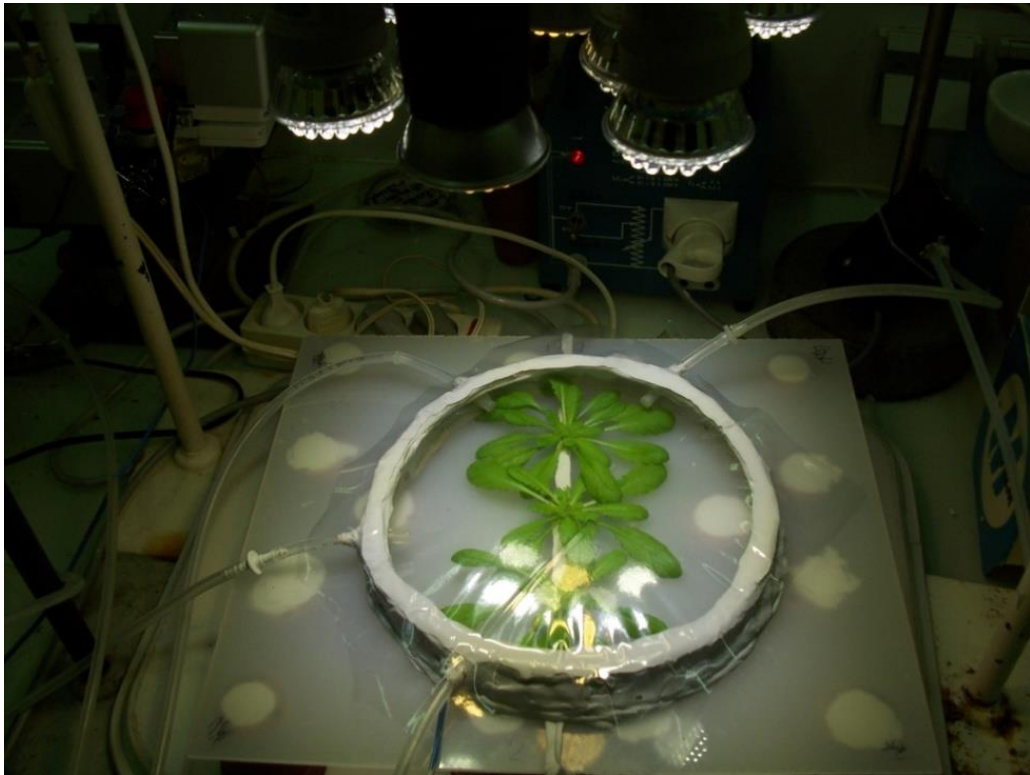
Le « Post Illumination Burst » (PIB) correspond à un pic de  $\text{CO}_2$  consécutif à l'extinction de la lumière, attribué à l'activité de la GDC qui continue de fonctionner quelques secondes car des métabolites en amont de cette enzyme sont encore engagés dans la voie photorespiratoire. Le PIB est mesuré sur des plantes adaptées pendant 30 min à  $100 \mu\text{L.L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  et  $1000 \mu\text{mol}$  de  $\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , en enregistrant l' $A_n$  pendant 10 min juste après l'extinction de la lumière (Laisk et Sumberg, 1994 ; Kebeish *et al.*, 2007).

### b) Mesures des paramètres de fluorescence chlorophyllienne

La lumière absorbée par les antennes collectrices des photosystèmes n'est pas totalement transformée en énergie chimique et une partie est perdue sous forme de chaleur et de fluorescence. A température ambiante, l'émission de cette fluorescence provient essentiellement du PSII et du LHCII. C'est lors de la fermeture des centres réactionnels que l'émission de la fluorescence chlorophyllienne des antennes collectrices du PSII augmente. La fluorescence est mesurée comme indiqué sur la figure 20. Une lumière modulée (LM ; pic d'absorption maximum à 630 nm, modulation entre 0,25 et 20 kHz) est d'abord appliquée afin de mesurer la fluorescence basale ( $F_0$  = tous les centres réactionnels du PSII sont « ouverts »). Puis un flash de lumière actinique non-modulée sursaturante (LSS ; pic d'absorption maximum à 630 nm, intensité lumineuse supérieure à  $7000 \mu\text{mol}$  de  $\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) est appliquée pendant 1 s, provoquant ainsi la fermeture de tous les centres réactionnels du PSII, et donnant lieu à l'émission de la fluorescence maximale  $F_m$ . Une lumière actinique non-modulée (LA ; intensité lumineuse de  $200 \mu\text{mol}$  de  $\text{photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  avec 90% de lumière rouge (pic d'absorption maximale à 635 nm) et 10% de lumière bleu (pic d'absorption maximale à 465 nm)) est ensuite appliquée, et la fluorescence va augmenter de nouveau pour diminuer et arriver à une valeur stable  $F_s$ , car il y a oxydation du pool de  $Q_A$  réduite et oxydation de l'eau, par photochimie. Enfin, un flash de LSS est de nouveau appliqué, il va provoquer la fermeture des centres réactionnels qui s'accompagne d'une fluorescence  $F_m'$ . Puis la lumière actinique est éteinte et la LM permet de mesurer la fluorescence  $F_0'$ , correspondant à la fluorescence quand tous les PSII sont « ouverts ».

On peut définir (Maxwell et Johnson, 2000):

- $F_v = F_m - F_0$ , correspondant à la fluorescence variable maximale émise après la fermeture de tous les centres réactionnels du PSII.
- $F_v' = F_m' - F_0'$ , correspondant à la fluorescence variable maximale émise par le PSII à la lumière.



**Figure 21.** Chambre d'échanges gazeux utilisée pour les marquages de  $^{13}\text{CO}_2$

Le NPQ (« non-photochemical quenching ») correspondant à la réduction de la fluorescence qui n'est pas issue de la dissipation par photochimie mais par dissipation par la chaleur et/ou par la transition en état 2 des antennes collectrices et/ou par photoinhibition, est calculé par la formule suivante:

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

Le rendement quantique du PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), correspondant à la proportion de la lumière absorbée par les antennes de PSII qui est utilisée pour la photochimie, est calculé par la formule suivante :

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s)/F_m'$$

L'ETR (« electron transfer rate ») exprimé en  $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , correspondant à la vitesse de transfert d'électrons photosynthétique au niveau du PSII, est calculé par la formule suivante :

$$ETR = \Phi_{PSII} \times (I) \times (\alpha_{\text{leaf}}) \times (\beta)$$

Avec  $I$  = intensité lumineuse ( $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ),  $\alpha_{\text{leaf}}$  = coefficient d'absorption de la lumière par la feuille (ici,  $\alpha_{\text{leaf}} = 0,85$  (Peterson et Havir, 2001)) et  $\beta$  = proportion de photons absorbés qui sont utilisés par le PSII par rapport à l'ensemble des PS (ici,  $\beta = 0,5$  (Earl et Tollenaar, 1998)).

Pour l'ensemble des mesures de fluorescence, les plantes sont adaptées pendant 30 min à l'obscurité, afin de s'assurer que tous les centres réactionnels des PSII soient ouverts, pour ensuite mesurer le  $F_0$  et le  $F_m$ . Puis les feuilles sont éclairées par une lumière actinique non modulée et les paramètres  $F_0'$ ,  $F_m'$  et  $F_v'$  sont mesurés selon la séquence décrite plus haut (environ 10 s pour une séquence) toutes les 6 min. Puis, au bout de 2 ou 3 h, la lumière actinique est éteinte, et la séquence continue d'être réalisée toutes les 10 min pendant 1 h, afin d'observer le retour de la valeur de  $F_m'$  vers celle de  $F_m$ .

### c) Conditions de marquages des plantes *A. thaliana* au $^{13}\text{CO}_2$

Au cours de ces marquages, pour chaque condition (transfert direct de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air, après 1 jour ou 5 jours de transfert dans l'air) et chaque génotype (Col-0, *amiRgox1/2* et *compl*), trois plantes âgées de 7 semaines (après 1h de lumière) sont transférées dans une chambre « faite maison » (Figure 19), permettant l'isolement spécifique de la partie aérienne des plantes, tout en maintenant la partie racinaire dans les pots en terreau. Le canal de référence du LiCOR traverse la chambre, afin d'analyser les échanges gazeux opérant dans

cette chambre. En parallèle, la chambre est connectée à une pompe faisant passer l'air interne ( $40 \text{ L.h}^{-1}$ ) par un système réfrigérant qui trempe dans un bain-marie à  $8^\circ\text{C}$ , afin de contrôler la température de l'air mais aussi d'assurer un renouvellement rapide de l'air (la pompe interne du LiCOR étant trop faible pour le volume d'air considéré dans la chambre ( $800 \text{ dm}^3$ )). Un thermocouple est rajouté dans la chambre sous une feuille afin de mesurer une température foliaire fiable. L'humidité est d'environ 65% dans la chambre avec un air entre  $21$  et  $23^\circ\text{C}$ , un éclairage de  $200 \mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (source LED blanches à spectre lumineux large) et une concentration en  $\text{CO}_2$  de  $380 \mu\text{L.L}^{-1}$  (valeur donnée par l'air sortant de la chambre). La surface foliaire éclairée, nécessaire pour le calcul des valeurs de photosynthèse, a été estimée avec le logiciel ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>) en utilisant des photos des plantes installées dans la chambre pour chaque expérience. Les plantes sont acclimatées 10 min à l'obscurité afin de s'assurer de l'étanchéité de la chambre, puis 45 min à la lumière, afin de s'assurer que les plantes ne soient pas stressées et que les stomates soient ouverts (valeurs de photosynthèse proches des valeurs mesurées dans la chambre 6400-40 LCF du LiCOR). Le marquage débute avec le remplacement de la bouteille de  $^{12}\text{CO}_2$  par une bouteille de gaz 99%  $^{13}\text{CO}_2$  et il dure 5 h. Les rosettes sont ensuite récoltées sous la lumière, après avoir ouvert rapidement la chambre pour la recouvrir d'azote liquide.

## 5) Analyse de métabolites

### a) Dosages de nitrates et d'ammonium

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à  $4^\circ\text{C}$  dans 1 mL de 100 mM HCl avec l'ajout de 1 spatule de PVP (Polyvinylpyridine). Après une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à  $4^\circ\text{C}$ , le surnageant est récupéré pour les dosages. Pour **les nitrates**, 10  $\mu\text{L}$  de surnageant sont mélangés à 40  $\mu\text{L}$  de 200 mM acide salicylique dilué dans 96% (v/v) d'acide sulfurique. Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'ion nitrosalicylate formé est révélé en ajoutant 950  $\mu\text{L}$  de 2 M NaOH, et quantifié par spectrophotométrie à 410 nm par comparaison avec une gamme étalon allant de 0 à 100 nmoles de  $\text{KNO}_3$  (Cataldo *et al.*, 1975). Pour **l'ammonium**, 10  $\mu\text{L}$  de surnageant sont mélangés à 0,5 mL de 0,33 M phénolate de sodium, pH 13, 0,5 mL de 1,5% (v/v) NaClO et 0,5 mL d'eau MilliQ. Après 1 h d'incubation à température ambiante, l'ammonium converti en monochloroamine va réagir avec le phénol pour produire un indophénol. Ce dernier est quantifié par spectrophotométrie à 635 nm par comparaison avec une gamme étalon allant de 0 à 1  $\mu\text{mole de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Tableau 4. Volumes utilisés pour le dosage du glucose et de l'amidon en microplaques**

	Extrait soluble	H <sub>2</sub> O	Solution S2	Solution S3
Glucose	100 µL	80 µL	50 µL	1 µL
Amidon	10 µL	170 µL	50 µL	1 µL

### b) Dosage des chlorophylles

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à 4°C dans 400 µL d'acétone à 100%. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré et conservé à 4°C à l'obscurité. Le culot est de nouveau extrait 2 à 3 fois avec 400 µL d'acétone à 80% (le culot doit devenir blanc). Les différents extraits sont mélangés et 50 µL sont utilisés pour le dosage de la chlorophylle par spectrophotométrie. Les quantités de chlorophylles exprimées en µg.mL<sup>-1</sup> sont calculées selon les formules suivantes (Porra *et al.*, 1989) :

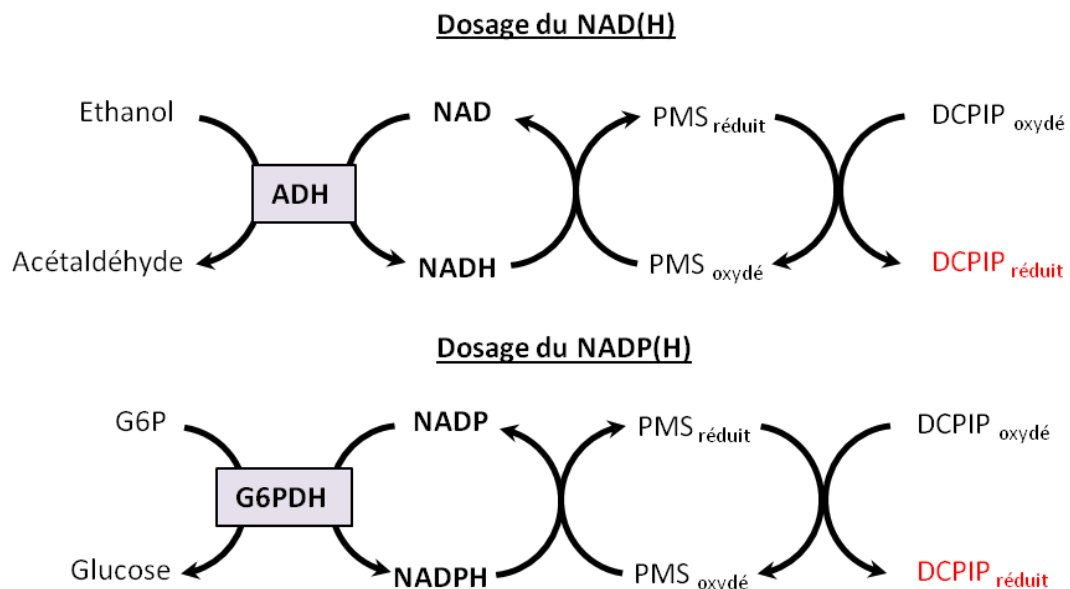
$$\text{Chl a} = 12,25 A_{663} - 2,55 A_{646}$$

$$\text{Chl b} = 20,31 A_{646} - 4,91 A_{663}$$

$$\text{Chl a} + \text{b} = 17,76 A_{646} - 7,34 A_{663}$$

### c) Dosage du glucose et de l'amidon

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à 4°C dans 1 mL de 1 M HClO<sub>4</sub>. Après une centrifugation à 10 000 g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et le culot est conservé pour le dosage de l'amidon. Pour le **dosage du glucose**, 400 µL de surnageant sont mélangés à 200 µL de 0,5M Tris-HCl, pH 7,5 puis le pH est ajusté à 7 en utilisant une solution de 5M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Après une deuxième centrifugation de 5 min à 10 000 g à 4°C, le surnageant est conservé pour le dosage du glucose. Pour le **dosage de l'amidon**, le culot est séché pendant 2 h à 60°C puis resuspendu dans 1 mL d'eau MilliQ et mis dans un bain-marie à 100°C pendant 2 h. Les macromolécules d'amidon vont se dérouler sous l'effet de la chaleur (rupture des liaisons intermoléculaires). Puis le pH est ajusté jusqu'à 5 par ajout de 0,2 M acétate de sodium, pH 4,8. L'amidon est ensuite digéré durant toute une nuit à 60°C en présence de 60 µL de solution de digestion S1 (tampon citrate pH 4,6 et 14 U amyloglucosidase.mL<sup>-1</sup>) du kit « Starch, UV-method » (R-Biopharm). Le **dosage du glucose libre, et du glucose issu de la dégradation de l'amidon** s'effectuent en microplaques. La solution S2 du kit est composée de 100 mM triethanolamine pH 7,6, 376 mM NADP, 376 mM ATP et la solution S3 du kit est composée des enzymes hexokinase (285 U.mL<sup>-1</sup>) et glucose-6-phosphate déshydrogenase (142 U.mL<sup>-1</sup>) (voir le tableau 4 pour les différents volumes ; il faut noter que la solution S2 est à rajouter au dernier moment). A pH 7, le glucose est converti en



**Figure 22.** Système de couplage enzymatique et de réactions d'oxydoréductions pour la quantification des cofacteurs NAD(H) et NADP(H) en microplaques. Les cofacteurs sont réduits par les enzymes respectives et le PMS les réoxyde directement. Par la suite, le PMS réduit est recyclé par la réduction du DCPIP, dont on suit l'extinction de son absorption à 600 nm par spectrophotométrie. ADH, alcool déshydrogénase ; PMS, phenazine méthosulfate ; DCPIP, dichlorophénolindophénol; G6P, glucose-6-phosphate ; G6PDH, glucose-6-phosphate déshydrogénase.



glucose-6-phosphate par l'hexokinase avec consommation d'ATP. Puis la glucose-6-phosphate déshydrogénase oxyde spécifiquement le glucose-6-phosphate avec le  $\text{NADP}^+$  pour former le D-gluconate-6-phosphate et du NADPH. C'est la réduction du  $\text{NADP}^+$  en NADPH qui est suivi par spectrophotométrie à 340 nm pendant 15 min. La quantité de glucose est calculée par :  $\text{DO}_{15 \text{ min}} - \text{DO}_0$  rapporté à une gamme étalon de glucose allant de 0 à 100 nmoles.

#### d) Dosage de $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ et $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés dans mortier préalablement refroidi avec de l'azote liquide. Les nucléotides à pyridine sous forme oxydée sont extraits avec 1 mL de 200 mM HCl (extraction acide) tandis que ceux sous forme réduite sont extraits avec 1 mL de 200 mM NaOH (extraction basique). Après une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 10 min à 4°C, 200  $\mu\text{L}$  de surnageant sont prélevés, et mis à bouillir pendant 2 min, afin d'inhiber toute activité enzymatique résiduelle. Les extraits sont conservés sur la glace, 50  $\mu\text{L}$  de 200 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,6 sont rajoutés et le pH est ajusté jusqu'à 7 avec ajout de 200 mM NaOH ou de 200 mM HCl (suivant l'extraction réalisée précédemment). Les dosages du NAD(H) et du NADP(H) se font avec 20  $\mu\text{L}$  d'extraits, par colorimétrie couplée à une activité enzymatique (activité alcool déshydrogénase pour NADH/NADPH et glucose-6-phosphate déshydrogénase pour  $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ ) en microplaques (3 réplicats techniques par échantillon, 6 échantillons de plantes et 4 points de gamme étalon par série de mesures) (voir figure 22 ; Queval *et al.*, 2007). Dans les quatre cas, c'est la réduction du DCPIP (2,6-Dichlorophénol IndoPhénol) qui est suivi par spectrophotométrie à 600 nm pendant 5 min. Les valeurs de  $\text{DO} \cdot \text{min}^{-1}$  sont comparées à la gamme étalon allant de 0 à 40 pmoles réalisée avec du  $\text{NAD}^+$ , NADH,  $\text{NADP}^+$  ou NADPH. Pour le **dosage du NAD(H)**, le milieu réactionnel final de 200  $\mu\text{L}$  se compose de HEPES-EDTA (50 mM-1mM), pH 7,5, 120  $\mu\text{M}$  DCPIP, 500  $\mu\text{M}$  PMS, 25 U ADH, éthanol 7,5% (v/v). Pour le **dosage du NADP(H)**, le milieu réactionnel final de 200  $\mu\text{L}$  est identique sauf que l'ADH et l'éthanol sont remplacés par 2 U G6PDH et 500  $\mu\text{M}$  G6P.

#### e) Dosage d'ATP et d'ADP

100 mg de feuilles de rosette d'*A. thaliana* sont congelés dans de l'azote liquide puis broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur à billes. La poudre obtenue est ensuite resuspendue à 4°C dans 500  $\mu\text{L}$  d'acide trichloroacétique à 2,3 % (v/v). Après une centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4°C, le pH du surnageant est ajusté à 7 par ajout de 1 mL de 500 mM Tris-acétate, pH 7,75. **L'ATP** est directement quantifié par luminescence

via l'activité de la luciférase de *Photinus pyralis*, qui à partir d'O<sub>2</sub>, d'ATP, de Mg<sup>2+</sup> et de D-luciférine, va produire de l'AMP, du phosphate inorganique, du CO<sub>2</sub>, de l'oxyluciférine et de la lumière. La luminescence est mesurée en RLU (unités relative de lumière) pendant 10 s avec un luminomètre pour microplaques (Fluostar). 10 µL d'extraits sont incubés avec 140 µL de 100 mM Tris-acétate, pH 7,75 pendant 5 min à l'obscurité à 25°C sous agitation orbitale à 500 rpm. Puis 50 µL de la solution commerciale du kit « Luminescent ATP Detection Assay Kit » (ABCAM) sont ajoutés et les extraits sont incubés 10 min à 25°C à l'obscurité sous agitation orbitale à 500 rpm avant de mesurer la luminescence. Une gamme étalon allant de 0 à 1 nmoles d'ATP est réalisée pour chaque plaque, pour pouvoir quantifier de façon absolue l'ATP dans les extraits. **L'ADP** est converti en ATP pendant 10 min à température ambiante avec 10 µL d'extrait dans 150 µL de milieu réactionnel final : 1 U pyruvate kinase, 1 mM PEP, 12.5 mM KCl<sub>2</sub> et 25 mM MgCl<sub>2</sub>. Puis l'ATP est de nouveau mesurée comme précédemment, avec la même gamme étalon (la conversion de l'ADP en ATP est quantitative). L'ADP formé est calculé par la formule suivante :  $ADP = ATP_{\text{après conversion}} - ATP_{\text{avant conversion}}$ .

#### f) Quantification relative du carbone et de l'azote totaux de feuilles de rosettes

Le passage des échantillons dans la machine, ainsi que le calcul des différents pourcentages ont été réalisés par Marlène Lamothe-Sibold avec un EA-IRMS (Elementar Analyser-Isotopic Ratio Mass Spectrometry), un appareil de la plateforme Métabolisme-Métabolome de l'IPS2. Des feuilles de rosettes de plantes sont prélevées dans de l'azote liquide et directement lyophilisées pendant 150 h. Puis, 2 mg de masse sèche sont pesés dans une capsule en étain. Les analyses de pourcentage de carbone et d'azote totaux sont réalisées avec un analyseur élémentaire (EA) Pyrocube couplé à un spectromètre de masse à ratio isotopique (IRMS). Les capsules sont brûlées dans un tube de combustion, les gaz qui s'échappent sont entraînés par de l'hélium à 240 mL.min<sup>-1</sup> dans des filtres à eau puis des tubes d'oxydation et de réduction (contenant de l'oxyde de cuivre, du fer, du cuivre réduit et de la laine d'argent). Le CO<sub>2</sub> reste piégé dans une colonne de désorption à température programmée tandis que le N<sub>2</sub> passe directement au travers de cette colonne pour être analysé par un conductimètre. Après la fin de l'analyse du N<sub>2</sub>, la colonne est chauffée à 110°C afin de libérer le CO<sub>2</sub>, qui après passage dans un second piège à eau, est aussi analysé par le conductimètre. Les pourcentages de carbone et d'azote sont déduits à partir d'une courbe de calibration réalisée avec les standards suivants : sulfate d'ammonium (N1IAEA et N2IAEA) 21,2 %N, acide glutamique (AGIAEA USGS40 et AGinterne) 40,82 %C et 9,51 %N, acétanilide (interne) 71,09 %C et 10,36 %N.

### g) Analyses métabolomiques

L'ensemble des analyses métabolomiques est réalisé avec les appareils de la plateforme Métabolisme-Métabolome de l'IPS2 en utilisant leurs protocoles, après une formation par les ingénieurs référents pour chaque technique/appareil.

#### *i) Extraction des métabolites primaires polaires*

Les extraits de feuilles de rosettes sont soit lyophilisés environ 100 h avant d'être soit broyés avec 2 billes de fer pendant 90s à 29 Hz à l'aide d'un broyeur électrique, soit broyés fraîchement avec un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide et dont la base baigne dans la glace. Les métabolites polaires sont extraits avec une solution de méthanol 80% (v/v) contenant 100  $\mu$ M  $\alpha$ -acide aminobutyrique ( $\alpha$ -ABA) (standard interne pour la quantification absolue des acides aminés en HPLC). Après une étape de centrifugation à 10 000 g pendant 15 min à 4°C, 1,5 mL de surnageant est prélevé et 150  $\mu$ L d'une solution d'adonitol (standard interne pour la quantification relative en GC-MS) à 200  $\mu$ M préparée dans du méthanol 80% (v/v) sont ajoutés. Le tout est vortexé, puis aliquoté en fractions de 0,2 mL qui sont séchées sous vide pendant 20 h dans un Speedvac. Un blanc d'extraction, ne contenant pas d'extrait de feuilles, est réalisé de la même façon pour chaque nouvelle série d'analyse.

#### *ii) Analyse relative des métabolites par GC-MS*

Pour une analyse globale comparative des métabolites primaires polaires en GC-MS, les molécules doivent être transformées chimiquement pour devenir volatiles. Les aliquotes de métabolites sont donc incubés, sous agitation orbitale à 200 rpm, 90 min à 30°C avec de la methoxyamine, puis 30 min à 37°C avec du N-méthyl-N-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA). Après 2 h de repos à température ambiante, 1  $\mu$ L (en mode splitless) de cette solution est injecté dans la GC-MS (Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse). Le liquide est vaporisé dans une chambre portée à 330°C, et les molécules rendues volatiles sont mélangées à la phase mobile gazeuse (hélium). Ces molécules sont éluées à travers une colonne capillaire RTX-5w/integra-Guard (30 m x 0.25 mm + 10 m de colonne de garde intégré (Restek)) par réaction d'adsorption-désorption avec un débit d'hélium de 1 mL.min<sup>-1</sup> le long d'un gradient de température allant de 80 à 330 °C pendant environ 30 min (voir Noctor *et al.*, 2007). Le gradient de température permet de rompre progressivement les interactions entre les molécules et la colonne et donc de séparer les métabolites dans le mélange. Les métabolites séparés sont ensuite ionisés par impact électronique avec une source à 70 eV, et les différents fragments ioniques résultant pour chacun des métabolites sont

propulsés dans un tube de vol. Ce tube étant sous vide, la séparation des ions dépend uniquement du rapport masse/charge ( $m/z$ ) selon la relation :

$$V = \sqrt{\frac{2zU}{m}} \quad \text{où}$$

$V$  = vitesse de l'ion,  
 $U$  = tension appliquée dans la source,  
 $z$  = charge de l'ion et  
 $m$  = masse de l'ion

L'identification des métabolites est établie par comparaison des spectres de  $m/z$  par rapport aux spectres de référence obtenus à partir de plusieurs bibliothèques de métabolites en libre accès, ainsi que les spectres de références des standards déjà injectés dans l'appareil, en fonction de leur indice de rétention. L'identification des métabolites et l'intégration des pics sont réalisées par le logiciel LECO Pegasus, en utilisant la bibliothèque de métabolites de la plateforme Métabolisme-Métabolome et après une vérification manuelle. Les échantillons sont comparés entre eux après la normalisation de chacune des aires calculées avec l'aire de l'adonitol (standard interne).

### iii) Analyse quantitative des acides aminés par HPLC

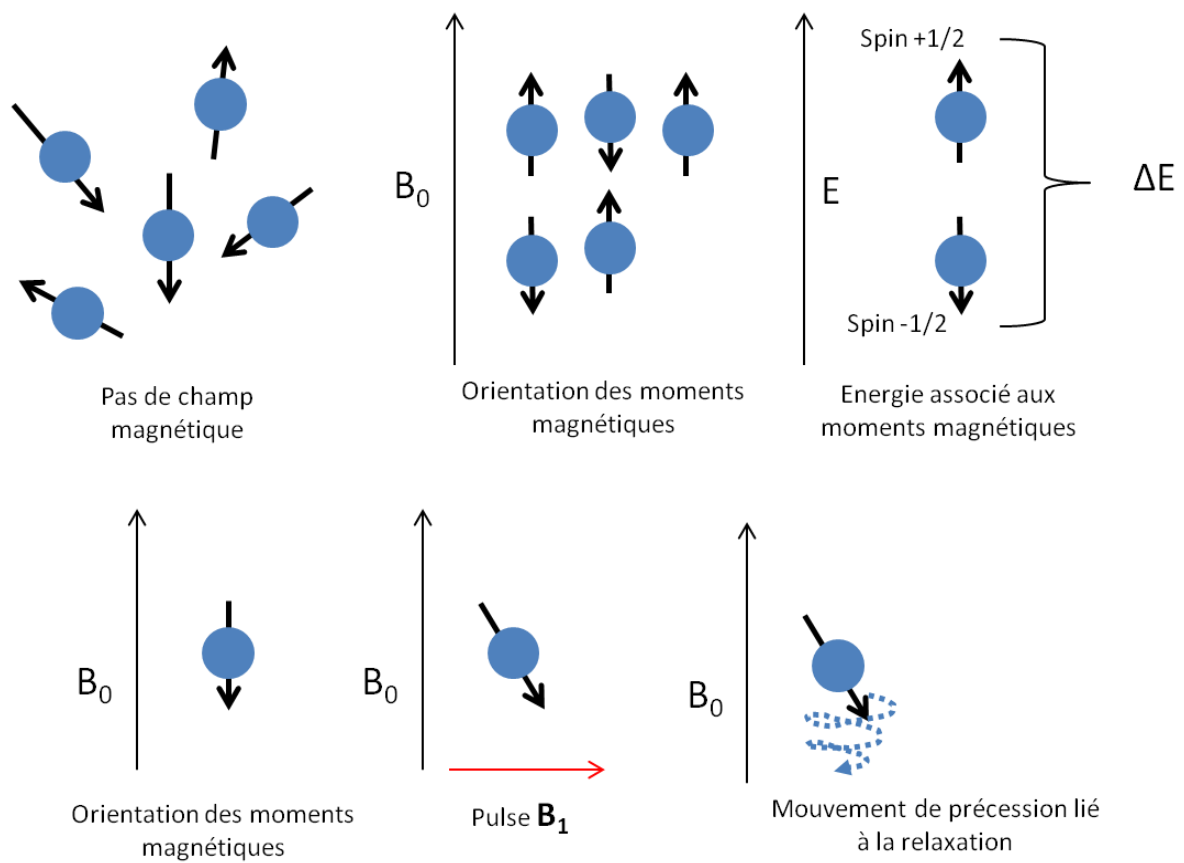
Pour une analyse quantitative de la plupart des acides aminés chez les plantes, les aliquotes des extractions de métabolites primaires polaires sont resuspendues dans 1,3 mL d'eau MilliQ, filtrées avec une seringue à travers un filtre de 0,2  $\mu\text{m}$  (Minisart RC4) avant d'être injectées dans l'HPLC (chromatographie liquide à haute performance ; Alliance Waters). 10  $\mu\text{L}$  du filtrat sont incubés 2 min dans la boucle d'injection de l'HPLC avec 10  $\mu\text{L}$  d'une solution d'ortho-phthaldialdéhyde (OPA) à 7,5  $\text{g.L}^{-1}$ , de  $\beta$ -mercaptoéthanol 2% (v/v), de méthanol 10% (v/v) dans un tampon borate de 500 mM à pH 9,5. Cette réaction permet de rendre les acides aminés fluorescents pour leur détection et leur quantification. L'OPA et le  $\beta$ -mercaptoéthanol réagissent avec la fonction amine des acides aminés contenus dans l'extrait afin de produire un dérivé stable fluorescent. Ce mélange est ensuite injecté dans la colonne et les acides aminés dérivés sont séparés pendant 40 min à 40 °C sur une colonne en phase inverse « Symmetry C<sub>18</sub> 3,5  $\mu\text{m}$  » (150 mm x 4,6 mm, Waters) avec un débit de 0,8  $\text{mL.min}^{-1}$  selon un gradient de deux tampons (tampon A : 20% méthanol, 50 mM acétate de sodium pH 5,9 (ajusté à l'acide acétique glacial), 0,1% tétrahydrofurane; tampon B : 80% méthanol, 50 mM acétate de sodium pH 5,9 (ajusté à l'acide acétique glacial) ; voir Noctor *et al.*, 2007). Les acides aminés dérivés sont observés avec un détecteur de fluorescence (Waters) (Les longueurs d'ondes de mesures sont de 340 nm pour l'excitation et de 455 nm pour l'émission). L'identification des acides aminés ainsi que leur quantification sont réalisées par

comparaison des temps de rétention avec un chromatogramme de référence, et les aires des chromatogrammes des échantillons avec des courbes de calibration spécifique à chaque acide aminé. Ces dernières sont réalisées avec des solutions préparées au laboratoire et un mélange commercial qui sert d'échantillon contrôle. Les aires des échantillons sont normalisées avec l'aire de l' $\alpha$ -ABA (standard interne) avant de ramener la quantité de matière mesurée au poids de l'échantillon prélevé.

### **h) Analyse quantitative du $^{13}\text{C}$ en Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN)**

#### ***i) Extraction des métabolites et préparation des échantillons pour la RMN***

Les échantillons de feuilles de rosettes marquées au  $^{13}\text{CO}_2$  ou au  $^{12}\text{CO}_2$  (témoin) qui ont été prélevés sont broyés pendant environ 20 min dans un mortier constamment refroidi par de l'azote liquide et dont la base baigne aussi dans l'azote liquide. Au cours du broyage, 900  $\mu\text{L}$  d'acide perchlorique à 70% sont ajoutés afin d'extraire les métabolites primaires polaires ainsi que 250  $\mu\text{moles}$  de maléate qui serviront de standard pour la quantification du signal  $^{13}\text{C}$  par RMN. Le broyat est ensuite récupéré dans un tube et 10 mL d'eau milliQ sont ajoutés. Après une étape de centrifugation à 15000 g pendant 15 min à 4°C, le surnageant est prélevé puis stocké à 4°C. Pendant ce temps, le culot est de nouveau extrait avec 3 mL d'acide perchlorique à 2% (resuspension avec une spatule métallique). Après une étape de centrifugation (15 min à 4°C à 15000 g), le surnageant est prélevé puis mélangé avec le premier surnageant. Le pH est alors ajusté à 5 au pH mètre avec une solution de 2M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  puis l'excès de  $\text{CO}_2$  gazeux formé est dégagé par de brèves agitations. A ce stade, un aliquote de 0,5 mL est prélevé pour d'éventuelles analyses de métabolites par GC-MS. Les extraits sont ensuite lyophilisés pendant environ 150 h. Le lyophilisat est resuspendu dans 1,1 mL d'eau MilliQ, et centrifugé à 5000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant (environ 0,9 mL) est mélangé avec 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$  (pour obtenir environ 10%  $\text{D}_2\text{O}$  final). Le  $\text{D}_2\text{O}$  permettra de « locker » le champ magnétique, c'est-à-dire de le régler à la bonne fréquence, et aussi de le « shimmer », c'est-à-dire d'homogénéiser la répartition du champ magnétique. Le pH des extraits est ajusté autour de 7 à la bandelette avec une solution de 5M KOH. Ceci permet d'éviter la dégradation de métabolites en phase aqueuse au cours de l'analyse, mais aussi de comparer les échantillons entre eux (en effet, le déplacement chimique des noyaux peut varier suivant le pH). Puis 2  $\mu\text{L}$  d'une solution de 1 mM  $\text{MnSO}_4$  sont ajoutés, afin de relaxer plus rapidement les noyaux lors du passage des échantillons en RMN (le  $\text{MnSO}_4$  peut complexer avec des noyaux et diminuer ainsi la force du champ magnétique reçu, et donc le temps de relaxation associé).



**Figure 23.** Schéma du principe de la Résonance Magnétique Nucléaire.  $B_0$  et  $B_1$ , champs magnétiques ;  $E$ , énergie ;  $\Delta E$ , différence entre les deux états d'énergies associés aux spins.

*ii) Principe de la RMN*

La RMN consiste en l'application d'un champ magnétique sur des noyaux atomiques, qui va orienter les spins de certains noyaux (moments magnétiques des noyaux). Les noyaux observables en RMN sont ceux ayant un spin nucléaire non nul (spin de  $+1/2$  ou  $-1/2$  par exemple pour le  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  ou  $^1\text{H}$ ) excepté  $^2\text{D}$ . L'application du champ entraîne donc des orientations parallèles ou anti parallèles au champ de ces spins. Statistiquement le nombre de noyaux parallèles est légèrement supérieur à celui des noyaux antiparallèles. L'écart énergétique qui va permettre de retourner les noyaux antiparallèles est donné par la mécanique quantique :

$$\Delta E = h\nu \quad \text{avec } \nu = (\gamma B)/2\pi$$

$\gamma$  : rapport gyromagnétique propre à chaque noyau  
 $B$  : champ magnétique  
 $\nu$  : constante de Planck  
 $h$  : fréquence de résonance

En d'autres mots, l'application d'un champ magnétique  $B_0$  (ici 400 MHz) permet de séparer énergétiquement les spins d'un noyau (moments magnétiques énergétiquement différents) (Figure 23). Et l'application d'un fort champ magnétique  $B_1$  perpendiculaire au premier champ  $B_0$  (énergie de rayonnement électromagnétique supérieur à  $\Delta E$ ) peut forcer la transition des spins de l'état énergétique le plus faible vers l'état énergétique supérieur (absorption de l'énergie du rayonnement électromagnétique par les noyaux ayant un spin  $-1/2$ ). Lorsque ce champ magnétique  $B_1$  cesse, la population de spins retourne vers son état d'équilibre de façon libre (relaxation) en décrivant un mouvement de rotation conique dont l'angle dépend de l'orientation initiale et de celle découlant du champ  $B_1$  (précession de Larmor) (Figure 23). C'est la fréquence de ce mouvement sinusoïdal qui est mesuré en RMN. Avec la transformation de Fourier, cette fréquence est convertie en un pic d'intensité unique. Le champ magnétique  $B_1$  appliqué sur un ensemble de noyaux (molécules) est généralement plus grand que le champ magnétique s'appliquant exactement sur chaque noyau, l'environnement électronique autour de chacun faisant « écran ». En effet, les mouvements des orbitales moléculaires génèrent des mouvements d'électrons qui s'opposent au champ magnétique appliqué (diamagnétisme ou « blindage »). Cependant, une forte polarisation des liaisons, des noyaux aromatiques (électrons délocalisables) peuvent aussi renforcer le champ magnétique perçu par certains noyaux (paramagnétisme). Donc, on applique un facteur de correction  $(1-\sigma)$  sur la fréquence  $\nu$ , où  $\sigma$  est la constante d'écran. Le signal RMN des noyaux est donc séparé selon leur environnement chimique. Afin de réduire la gamme de fréquences



détectées par le spectromètre, les fréquences des noyaux détectés sont rapportées à celle d'un standard (Tetraméthylsilane) correspondant au 0 du déplacement chimique :

$$(\nu_{\text{ech}} - \nu_{\text{ref}}) = \text{déplacement chimique exprimé en partie par million.}$$

On obtient donc un spectre avec des valeurs de déplacement chimique en abscisse et l'intensité du signal de résonnance en ordonnée.

### iii) Analyses par RMN

Afin d'augmenter le rapport signal/bruit, la séquence d'acquisition est répétée avec 2600 scans, afin d'additionner l'intensité des signaux. Pour faciliter l'analyse des spectres RMN, les signaux des noyaux  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  sont découplés par uniformisation des spins  $^1\text{H}$  avec l'application d'un champ magnétique  $B_1$  à spectre large: 9 Watts pendant l'acquisition du signal des noyaux  $^{13}\text{C}$  et 0,17 Watts pendant la phase de latence. L'excitation des noyaux  $^{13}\text{C}$  est réalisée avec des impulsions de 9,75  $\mu\text{s}$  de puissance égale à 42 Watts, la phase de relaxation est programmée à 15 s. Ainsi l'acquisition de la séquence est de 1,36 s avec un balayage de 24 kHz, centré sur la fréquence 10,06 kHz et le signal est numérisé par des séries de 65000 points. Les spectres sont phasés et la ligne de base est corrigée avant toute procédure d'intégration des signaux. L'identité positionnelle des noyaux associés aux métabolites ( $\text{COOH}$ ,  $\text{CHOH}$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CHNH}_2$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ) est déterminée par comparaison des déplacements chimiques observés avec des standards purs passés en RMN dans des conditions équivalentes (voir Annexe I pour la table des déplacements chimiques des standards utilisés et Annexes II pour un exemple de spectre RMN avec l'identification des positions de métabolites). La quantification absolue des aires des spectres des noyaux  $^{13}\text{C}$  par RMN a été réalisée par rapport à l'aire du noyau  $^{13}\text{C}$  de la liaison  $\text{C}=\text{C}$  du standard maléate présent dans chaque tube dont la quantité de  $^{13}\text{C}$  est connue (250  $\mu\text{moles}$  de maléate par tube de RMN, soit 5,5  $\mu\text{moles}$  de  $^{13}\text{C}$  en abondance naturelle pour ces 2 carbones). Comme la réponse du signal RMN pour des noyaux  $^{13}\text{C}$  avec des environnements électroniques différents n'est pas identique, et afin de s'assurer que les conditions de RMN choisies soient quantitatives, une courbe de calibration est réalisée avec différentes concentrations de thréonine et toujours la même quantité de maléate. Les coefficients de réponse des différentes fonctions de la thréonine étaient les suivants (exprimés en unités maléate (UM), soit 5,5  $\mu\text{moles}$  de  $^{13}\text{C}$  de la liaison  $\text{C}=\text{C}$ ) :

COOH (Thr-C1) : 0,2846 mM/UM  
 CHNH<sub>2</sub> (Thr-C2) : 0,3198 mM/UM  
 CHOH (Thr-C3) : 0,3271 mM/UM  
 CH<sub>3</sub> (Thr-C4) : 0,3035 mM/UM

Ces coefficients sont utilisés pour normaliser l'intensité du signal <sup>13</sup>C sur les différentes positions observées, afin de les comparer entre elles.

Le pourcentage d'allocation de <sup>13</sup>C pour une position *i* par rapport à la somme *n* des positions des métabolites détectés en RMN est calculé selon la formule suivante :

$$^{13}C A_i = \frac{^{13}C S_i - ^{12}C S_i}{\sum_{k=1}^n ^{13}C S_k - \sum_{k=1}^n ^{12}C S_k}$$

Avec <sup>13</sup>C S<sub>i</sub> = signal <sup>13</sup>C de la position *i* détecté après 5 h de marquage corrigé par la thréonine  
<sup>12</sup>C S<sub>i</sub> = signal <sup>13</sup>C de la position *i* détecté en abondance naturelle dans les mêmes conditions corrigé par la thréonine

### i) Analyse de la discrimination isotopique en <sup>13</sup>C des GOX en abondance naturelle

#### i) Discrimination isotopique d'une enzyme pour le <sup>13</sup>C et l'effet isotopique associé

La signature isotopique <sup>13</sup>C (δ<sup>13</sup>C) d'un composé est définie par la relation suivante :

$$\delta^{13}C = \frac{R_{ech} - R_{std}}{R_{std}}$$

Où R<sub>ech</sub> est le rapport de la quantité totale de <sup>13</sup>C sur celle de <sup>12</sup>C dans l'échantillon. Std correspond au rapport de la quantité totale de <sup>13</sup>C sur celle de <sup>12</sup>C dans un standard servant de référentiel (ici, pour le <sup>13</sup>C la référence est le rostre de bélemnite), pour lequel R<sub>std</sub> = 0,0112372. Les isotopes lourds (comme le <sup>13</sup>C) présentent la particularité d'avoir une énergie de liaison plus élevée que les isotopes légers. Concrètement, il faudra fournir plus d'énergie pour casser ou former une liaison <sup>13</sup>C-<sup>12</sup>C qu'une liaison <sup>12</sup>C-<sup>12</sup>C. Ainsi, lors d'une réaction enzymatique impliquant la rupture ou bien la création d'une liaison, le remplacement dans le substrat d'un isotope léger impliqué dans cette liaison, par un isotope lourd, peut affecter la catalyse enzymatique. Si l'énergie à fournir par l'enzyme pour casser ou créer la liaison est

supérieure à sa propre énergie d'activation, la réaction ne se fait pas. Dans certains cas, il peut arriver que le remplacement de l'isotope léger par l'isotope lourd facilite la réaction (cas de « tunneling » avec le remplacement de  $^1\text{H}$  par  $^2\text{D}$ ). Dès lors, l'affinité de l'enzyme pour le substrat contenant du  $^{13}\text{C}$  peut être jaugée au cours de la réaction en comparant le  $\delta^{13}\text{C}$  du substrat et du produit de la réaction au cours du temps, correspondant à la discrimination isotopique de l'enzyme pour le substrat ( $\Delta^{13}\text{C}$ ) exprimée en ‰:

$$\Delta^{13}\text{C} = \frac{R_{\text{substrat}} - R_{\text{produit}}}{R_{\text{produit}}} = \alpha - 1$$

Avec  $\alpha$  = effet isotopique cinétique associé (KIE = vitesse de réaction avec le substrat  $^{13}\text{C}$ /vitesse de réaction avec le substrat  $^{12}\text{C}$ ),  $R_{\text{substrat}}$  = rapport de la quantité totale de  $^{13}\text{C}$  sur celle de  $^{12}\text{C}$  dans le substrat et  $R_{\text{produit}}$  = rapport de la quantité totale de  $^{13}\text{C}$  sur celle de  $^{12}\text{C}$  dans le produit.

On voit bien dans cette relation que lorsque la réaction est totale, la discrimination isotopique n'existe plus, et l'effet isotopique cinétique est nul. Si l'enzyme préfère le substrat « lourd », l'effet est négatif, si c'est l'inverse, il est positif.

Dans notre cas, seul le glycolate a pu être détecté et séparé convenablement en LC-co-IRMS afin d'avoir la signature isotopique la plus fiable possible. Dans ce cas précis, le système de Rayleigh, décrivant une réaction unidirectionnelle, arrêtée avant qu'elle ne soit totale, est utilisé. Le rapport isotopique du glycolate à un instant  $t$ , en supposant un effet isotopique  $\alpha$  constant au cours du temps, est donné par la relation :

$$\ln(R_{\text{glycolate}}) = \ln(R_{\text{glycolate } t_0}) + \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \ln\left(\frac{[\text{glycolate}]}{[\text{glycolate}_{t_0}]}\right)$$

On peut alors exprimer l'effet isotopique  $\alpha$  comme suit :

$$\alpha = \frac{\ln\left(\frac{[\text{glycolate}]}{[\text{glycolate}_{t_0}]}\right)}{\ln\left(\frac{[\text{glycolate}]}{[\text{glycolate}_{t_0}]}\right) + \ln\left(\frac{R_{\text{glycolate}}}{R_{\text{glycolate } t_0}}\right)}$$

*ii) Analyse de la signature isotopique  $^{13}\text{C}$  ( $\delta^{13}\text{C}$ ) du glycolate*

Pour ces expériences, les GOX recombinantes sont dessalées dans le tampon contenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 100  $\mu\text{M}$  FMN mais sans glycérol, car il interfère dans la séparation du glycolate avec le mélange réactionnel. Les réactions se déroulent à 30°C avec 1 mM de glycolate ou de 2,2- $d_2$ -glycolate dans 50 mM Tris-HCl, pH 8, ou bien 200  $\mu\text{M}$  de glycolate ou de 2,2- $d_2$ -glycolate dans 10 mM Tris-HCl, pH 8 dans 5 mL de volume final. Elles sont arrêtées à 4 temps différents allant de 0 à 30 min avec 1 mL de 1M HCl, puis lyophilisées 100 h avant d'être resuspendues dans 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée. L'analyse de la signature isotopique du glycolate est réalisée par LC-co-IRMS (chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à ratio isotopique). L'installation des équipements et la mise au point de la technique, notamment afin d'avoir une réaction quantitative pour la transformation des fractions liquides en gaz, est réalisée par Caroline Mauve de la Plateforme Métabolome-Métabolisme de l'IPS2. 50  $\mu\text{L}$  d'échantillons sont injectés sur une colonne RS PAK KC-811 (Shodex) préalablement chauffé à 30°C avec de l'eau MilliQ comme phase mobile à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> afin de séparer le glycolate du mélange réactionnel par chromatographie d'échange d'anions. La quantité de glycolate est déterminée à l'aide d'un refractomètre chauffé à 35°C en aval de la colonne et d'une courbe étalon réalisée avec une solution pure de glycolate (0 à 10 mM) (voir Annexe III.1 pour un exemple de spectre). L'HPLC a été couplée directement à l'IRMS par une Liquiface, afin de convertir le carbone présent dans le glycolate dans une phase liquide en CO<sub>2</sub> gazeux, pour l'analyse par IRMS. La réaction d'oxydation chimique s'est déroulée dans une chambre portée à 100 °C en présence de 15% (m/v) de persulfate d'ammonium et de 2,5% (v/v) d'acide ortho-phosphorique avant de passer dans une membrane d'extraction qui purge et extrait le CO<sub>2</sub> du liquide avec de l'hélium à un débit de 15 mL.min<sup>-1</sup>. Le gaz est ensuite passé au travers d'une membrane Nafion® et il est séché avec de l'hélium à un débit de 50 mL.min<sup>-1</sup> en sens inverse, afin d'éliminer les traces éventuelles d'eau. Dans l'IRMS, les molécules de CO<sub>2</sub> sont ionisées par la source (400  $\mu\text{A}$ ), puis soumises à une tension d'accélération (3700-3800 V) dans le vide, qui leur donnent une vitesse initiale. Leurs trajectoires sont ensuite déviées par un champ magnétique (3-4 A) et les ions sont recueillis séparément dans les collecteurs (ou « coupes de Faraday ») reliés à des amplificateurs électriques (voir Annexe III.2 pour un exemple de spectre). Pour le carbone, les collecteurs reçoivent les particules de masses 44, 45 et 46 g/mol correspondant aux molécules  $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ ,  $^{13}\text{C}^{17}\text{O}_2$ ,  $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$  et  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$ . Les rapports de masse 45/44 et 46/44 pour les échantillons et les gaz de référence sont corrigés par l'équation suivante, afin de correspondre uniquement aux rapports  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$

respectivement :

$$\delta^{13}C = c_1 \delta_{\frac{45}{44}} + c_2 \delta^{18}O$$

$$\delta^{18}O = c_3 \delta_{46/44} + c_4 \delta^{13}C$$

Où  $c_1$ ,  $c_2$ ,  $c_3$ , et  $c_4$  sont les constantes de Craig :  $c_1 = 1,0676$   $c_2 = -0,0338$   $c_3 = 1,0010$  et  $c_4 = -0,0021$

Puis les valeurs de  $\delta^{13}C$  des échantillons sont de nouveau corrigées avec la calibration du gaz de référence par rapport au standard (ici, rostre de bélemnite) par la formule suivante :

$$\delta_{std}^{13}C_{\text{échantillon}} = \delta_{réf}^{13}C_{\text{échantillon}} (\delta_{std}^{13}C_{réf} + 1) + \delta_{std}^{13}C_{réf}$$

Les rapports sont aussi corrigés par la légère déviation du  $\delta^{13}C$  de la gamme étalon journalière ( $0,2 \text{ ‰}$ ). Les effets isotopiques associés à la discrimination isotopique sont calculés avec la formule décrite par le système de Rayleigh, les rapports  $^{13}C/^{12}C$  corrigés du glycolate obtenus par IRMS et les concentrations en glycolate obtenues par l'HPLC.

# **Bibliographie**

## A

- Abat JK, Mattoo AK, Deswal R** (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition: S-nitrosylated proteins of *Kalanchoe pinnata*, a CAM plant. *FEBS Journal* **275**: 2862–2872
- Abat JK, Saigal P, Deswal R** (2008) S-Nitrosylation—another biological switch like phosphorylation? *Physiology and Molecular Biology of Plants* **14**: 119–130
- Albery WJ, Knowles JR** (1976) Free-energy profile of the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase. *Biochemistry* **15**: 5627–5631
- Alonso JM, Stepanova NS, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Paul S, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Hashim D, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657
- Anderson LE**, (1971) Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases. *Biochimica et Biophysica Acta* **235**: 237–244
- Araujo WL, Nunes-Nesi A, Trenkamp S, Bunik VI, Fernie AR** (2008) Inhibition of 2-Oxoglutarate Dehydrogenase in Potato Tuber Suggests the Enzyme Is Limiting for Respiration and Confirms Its Importance in Nitrogen Assimilation. *Plant Physiology* **148**: 1782–1796
- Arooj M, Sakthiah S, Cao G ping, Lee KW** (2013) An Innovative Strategy for Dual Inhibitor Design and Its Application in Dual Inhibition of Human Thymidylate Synthase and Dihydrofolate Reductase Enzymes. *PLoS One* **8**: e60470
- Arrivault S, Guenther M, Ivakov A, Feil R, Vosloh D, van Dongen JT, Sulpice R, Stitt M** (2009) Use of reverse-phase liquid chromatography, linked to tandem mass spectrometry, to profile the Calvin cycle and other metabolic intermediates in *Arabidopsis* rosettes at different carbon dioxide concentrations. *The Plant Journal* **59**: 826–839
- Avice J-C, Etienne P** (2014) Leaf Senescence and nitrogen remobilization efficiency in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* **65**: 3813–3824
- Avila-Ospina L, Marmagne A, Talbotec J, Krupinska K, Masclaux-Daubresse C** (2015) The identification of new cytosolic glutamine synthetase and asparagine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.), and their expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **66**: 2013–2026
- Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C** (2014) Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany* **65**: 3799–3811

## B

- Barak S, Nejdat A, Heimer Y, Volokita M** (2001) Transcriptional and posttranscriptional regulation of the glycolate oxidase gene in tobacco seedlings. *Plant Molecular Biology* **45**: 399–407
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* **15**: 330–336
- Bauwe H, Kolukisaoglu U** (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1523–1535



- Bensmihen S, To A, Lambert G, Kroj T, Giraudat J, Parcy F** (2004) Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Letter* **561**: 127–131
- Benstein RM, Ludewig K, Wulfert S, Wittek S, Gigolashvili T, Frerigmann H, Gierth M, Flugge U-I, Krueger S** (2013) Arabidopsis Phosphoglycerate Dehydrogenase1 of the Phosphoserine Pathway Is Essential for Development and Required for Ammonium Assimilation and Tryptophan Biosynthesis. *The Plant Cell* **25**: 5011–5029
- Bloom AJ** (2015) Photorespiration and nitrate assimilation: a major intersection between plant carbon and nitrogen. *Photosynthesis Research* **123**: 117–128
- Bloom AJ, Burger M, Rubio Ascencio JS, Cousins AB** (2010) Carbon dioxide enrichment inhibits nitrate assimilation in Wheat and Arabidopsis. *Science* **328**: 899–902
- Bloom AJ, Caldwell RM, Finazzo J, Warner RL, Weissbart J** (1989) Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. *Plant Physiology* **91**: 352–356
- Bloom AJ, Smart DR, Nguyen DT, Searles PS** (2002) Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**: 1730–1735
- Boex-Fontvieille E, Gauthier P, Gilard F, Hodges M, Tcherkez G** (2013) A new anaplerotic respiratory pathway involving lysine biosynthesis in isocitrate dehydrogenase-deficient Arabidopsis mutants. *New Phytologist* **199**: 673–682.
- Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H** (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the Last Unknown Enzyme in the Photorespiratory Cycle in Arabidopsis, Belongs to a Novel Kinase Family. *The Plant Cell* **17**: 2413–2420
- Bourhis JM, Vignaud C, Pietrancosta N, Gueritte F, Guenard D, Lederer F, Lindqvist Y** (2009) Structure of human glycolate oxidase in complex with the inhibitor 4-carboxy-5-[(4-chlorophenyl)-sulfanyl]-1,2,3-thiadiazole. *Acta Crystallographica* **65** : 1246–1253
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254
- Brandes HK, Larimer FW, Hartman FC** (1996) The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin f. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 3333–3335
- Bykova NV, Keerberg O, Pärnik T, Bauwe H, Gardeström P** (2005) Interaction between photorespiration and respiration in transgenic potato plants with antisense reduction in glycine decarboxylase. *Planta* **222**: 130–140

## C

- Caffarri S, Tibiletti T, Jennings RC, Santabarbara S** (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein and Peptide Science* **15**: 296–331
- Campbell WJ, Ogren WL** (1990) Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts. *Photosynthesis Research* **23**: 257–268
- Carvalho J, Madgwick PJ, Powers SJ, Keys AJ, Lea PJ, Parry MA** (2011) An engineered pathway for glyoxylate metabolism in tobacco plants aimed to avoid the release of ammonia in photorespiration. *BMC Biotechnology* **11**: 111

- Cascales-Minana B, Munoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Anoman AD, Pertusa J, Alaiz M, Osorio S, Fernie AR, Segura J, Ros R** (2013) The Phosphorylated Pathway of Serine Biosynthesis Is Essential Both for Male Gametophyte and Embryo Development and for Root Growth in Arabidopsis. *The Plant Cell* **25**: 2084–2101
- Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs, VL** (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **6**: 71–80
- Chastain CJ, Ogren WL** (1989) Glyoxylate inhibition of ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activation state in vivo. *Plant and Cell Physiology* **30**: 937–944
- Chern M, Bai W, Chen X, Canlas PE, Ronald PC** (2013) Reduced expression of glycolate oxidase leads to enhanced disease resistance in rice. *PeerJ* **1**: e28
- Christensen KE, MacKenzie RE** (2006) Mitochondrial one-carbon metabolism is adapted to the specific needs of yeast, plants and mammals. *BioEssays* **28**: 595–605
- Cleland WW** (2005) The use of isotope effects to determine enzyme mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **433**: 2–12
- Cleland WW, Andrews TJ, Gutteridge S, Hartman FC, Lorimer GH** (1998) Mechanism of Rubisco: The Carbamate as General Base x. *Chemical Reviews* **98**: 549–562
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 735–743
- Collakova E, Goyer A, Naponelli V, Krassovskaya I, Gregory JF, Hanson AD, Shachar-Hill Y** (2008) *Arabidopsis* 10-Formyl Tetrahydrofolate Deformylases Are Essential for Photorespiration. *The Plant Cell* **20**: 1818–1832
- Cook C, Mulligan M, Tolbert NE** (1985) Inhibition and stimulation of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase by glyoxylate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **240**: 392–401
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM** (1998) *Arabidopsis* gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes: implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *The Plant Cell* **10**: 741–752
- Cossins E, Shah S** (1972) Pteroylglutamates of higher plant tissues. *Phytochemistry* **11**: 587–593
- Cossins EA** (2000) The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Botany* **78**: 691
- Covshoff S, Burgess SJ, Kneřová J, Kümpers BMC** (2014) Getting the most out of natural variation in C4 photosynthesis. *Photosynthesis Research* **119**: 157–167

## D

- Dai S, Johansson K, Miginiac-Maslow M, Schürmann P, Eklund H** (2004) Structural basis of redox signaling in photosynthesis: structure and function of ferredoxin:thioredoxin reductase and target enzymes. *Photosynthesis Research* **79**: 223–248
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB** (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* **1**(4) : 19–21
- Dellero Y, Lamothe-Sibold M, Jossier M, Hodges M** (2015b) *Arabidopsis thaliana ggt1* photorespiratory mutants maintain leaf carbon/nitrogen balance by reducing RuBisCO content and plant growth. *The Plant Journal* **83**: 1005–1018
- Dellero Y, Mauve C, Boex-Fontvieille E, Flesch V, Jossier M, Tcherkez G, Hodges M** (2015a) Experimental Evidence for a Hydride Transfer Mechanism in Plant Glycolate Oxidase Catalysis. *Journal of Biological Chemistry* **290**: 1689–1698
- Desai UJ, Pfaffle PK** (1995) Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **19**: 780–784

- Devi MT, Rajagopalan AV, Raghavendara AS** (1996) Purification and properties of glycolate oxidase from plants with different photosynthetic pathways: Distinctness of C4 enzyme from that of a C3 species and a C3–C4 intermediate. *Photosynthesis research* **47**: 231–238
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C** (2005) Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**: 74–83
- Diệp Lê KH, Lederer F** (1991) Amino acid sequence of long chain  $\alpha$ -hydroxy acid oxidase from rat kidney: a member of the family of FMN-dependent  $\alpha$ -hydroxy acid-oxidizing enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 20877–20881
- Distelfeld A, Avni R, Fischer AM** (2014) Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *Journal of Experimental Botany* **65**: 3783–3798
- van Doorn WG** (2008) Is the onset of senescence in leaf cells of intact plants due to low or high sugar levels? *Journal of Experimental Botany* **59**: 1963–1972
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rébeillé F** (2001) The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**: 167–176

## E

---

- Earl HJ, Tollenaar M** (1998) Relationship between thylakoid electron transport and photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake in leaves of three maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Photosynthesis Research* **58**: 245–257
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research* **19**: 1349
- Engel N, Ewald R, Gupta KJ, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe H** (2011) The Presequence of *Arabidopsis* Serine Hydroxymethyltransferase SHM2 Selectively Prevents Import into Mesophyll Mitochondria. *Plant Physiology* **157**: 1711–1720
- Engel N, van den Daele K, Kolukisaoglu U, Morgenthal K, Weckwerth W, Parnik T, Keerberg O, Bauwe H** (2007) Deletion of Glycine Decarboxylase in *Arabidopsis* Is Lethal under Nonphotorespiratory Conditions. *Plant physiology* **144**: 1328–1335
- Engqvist MK, Kuhn A, Wienstroer J, Weber K, Jansen EE, Jakobs C, Weber AP, Maurino VG** (2011) Plant D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase participates in the catabolism of lysine especially during senescence. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 11382–11390
- Engqvist MK, Schmitz J, Gertzmann A, Florian A, Jaspert N, Arif M, Balazadeh S, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Maurino VG** (2015) GLYCOLATE OXIDASE3, a glycolate oxidase homolog of yeast L-lactate cytochrome c oxidoreductase, supports L-lactate oxidation in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **169**: 1042–1061
- Esser C, Kuhn A, Groth G, Lercher MJ, Maurino VG** (2014) Plant and animal glycolate oxidases have a common eukaryotic ancestor and convergently duplicated to evolve long-chain 2-hydroxy acid oxidases. *Molecular Biology and Evolution* **31**: 1089–1101

## F

---

- Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanon MI, Andreo CS, Fernie AR, Drincovich MF, Flugge U-I, Maurino VG** (2007) Alteration of Organic Acid Metabolism in *Arabidopsis* Overexpressing the Maize C4 NADP-Malic Enzyme Causes Accelerated Senescence during Extended Darkness. *Plant Physiology* **145**: 640–652

- Fahnenstich H, Scarpeci TE, Valle EM, Flugge U-I, Maurino VG** (2008) Generation of Hydrogen Peroxide in Chloroplasts of *Arabidopsis* Overexpressing Glycolate Oxidase as an Inducible System to Study Oxidative Stress. *Plant Physiology* **148**: 719–729
- Farquhar GD, von Caemmerer S von, Berry JA** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* **149**: 78–90
- Fendrich G, Ghisla S** (1982) Studies of glycolate oxidase from pea leaves. Determination of stereospecificity and mode of inhibition by  $\alpha$ -hydroxybutyrate. *Biochimica et Biophysica Acta* **702**: 242–248
- Feng Z, Zhang B, Ding W, Liu X, Yang DL, Wei P, Cao F, Zhu S, Zhang F, Mao Y, Zhu JK** (2013) Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research* **23**: 1229–1232
- Finazzi G, Johnson GN, Dalosto L, Joliot P, Wollman F-A, Bassi R** (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12375–12380
- Fitzpatrick PF** (2007) Insights into the mechanisms of flavoprotein oxidases from kinetic isotope effects. *Journal of Labelled Compounds Radiopharmaceuticals* **50**: 1016–1025
- Flor HH** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**: 275–296
- Florian A, Araujo WL, Fernie AR** (2013) New insights into photorespiration obtained from metabolomics. *Plant Biology* **15**: 656–666
- Florian A, Nikoloski Z, Sulpice R, Timm S, Araújo WL, Tohge T, Bauwe H, Fernie AR** (2014a) Analysis of Short-Term Metabolic Alterations in *Arabidopsis* Following Changes in the Prevailing Environmental Conditions. *Molecular Plant* **7**: 893–911
- Florian A, Timm S, Nikoloski Z, Tohge T, Bauwe H, Araújo WL, Fernie AR** (2014b) Analysis of metabolic alterations in *Arabidopsis* following changes in the carbon dioxide and oxygen partial pressures: Response to alterations in gaseous environment. *Journal of Integrative Plant Biology* **56**: 941–959
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009) Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 455–484
- Foyer CH, Noctor G, Hodges M** (2011) Respiration and nitrogen assimilation: targeting mitochondria-associated metabolism as a means to enhance nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1467–1482
- Friend AD** (2010) Terrestrial plant production and climate change. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1293–1309
- Furuichi M, Suzuki N, Dhakshnamoorthy B, Minagawa H, Yamagishi R, Watanabe Y, Goto Y, Kaneko H, Yoshida Y, Yagi H** (2008) X-ray Structures of *Aerococcus viridans* Lactate Oxidase and Its Complex with d-Lactate at pH 4.5 Show an  $\alpha$ -Hydroxyacid Oxidation Mechanism. *Journal of Molecular Biology* **378**: 436–446

## G

- Gadda G** (2008) Hydride transfer made easy in the reaction of alcohol oxidation catalyzed by flavin-dependent oxidases. *Biochemistry* **47**: 13745–53
- Gambino G, Boccacci P, Margaria P, Palmano S, Gribaudo I** (2013) Hydrogen peroxide accumulation and transcriptional changes in grapevines recovered from flavescence dorée disease. *Phytopathology* **103**: 776–784

- Garmier M, Priault P, Vidal G, Driscoll S, Djebbar R, Boccara M, Mathieu C, Foyer CH, De Paepe R** (2007) Light and Oxygen Are Not Required for Harpin-induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 37556–37566
- Gauthier PPG, Bligny R, Gout E, Mahé A, Nogués S, Hodges M, Tcherkez GGB** (2010) In folio isotopic tracing demonstrates that nitrogen assimilation into glutamate is mostly independent from current CO<sub>2</sub> assimilation in illuminated leaves of *Brassica napus*. *New Phytologist* **185**: 988–999
- Ghisla S, Massey V** (1977) Studies on the mechanism of action of the flavoenzyme lactate oxidase. Proton uptake and release during the binding of the transition state analogs. *Journal of Biological Chemistry* **252**: 6729–6735
- Gilbert BM, Wolpert TJ** (2013) Characterization of the *LOVI* -Mediated, Victorin-Induced, Cell-Death Response with Virus-Induced Gene Silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 903–917
- Giovanelli J, Mudd SH, Datko AH** (1985) In vivo regulation of de novo methionine biosynthesis in a higher plant (*Lemna*). *Plant Physiology* **77**: 450–455
- Gluzak K, Kafarski P** (2013) in *Drug Discovery* (El-Shemy, HA editions) pp. 325–372, InTech, 10.5772/52504
- Guo Y, Gan S-S** (2012) Convergence and divergence in gene expression profiles induced by leaf senescence and 27 senescence-promoting hormonal, pathological and environmental stress treatments: Comparative transcriptomics of leaf senescence. *Plant, Cell & Environment* **35**: 644–655

## H

- Hackenberg C, Kern R, Hugel J, Stal LJ, Tsuji Y, Kopka J, Shiraiwa Y, Bauwe H, Hagemann M** (2011) Cyanobacterial Lactate Oxidases Serve as Essential Partners in N<sub>2</sub> Fixation and Evolved into Photorespiratory Glycolate Oxidases in Plants. *The Plant Cell* **23**: 2978–2990
- Hanning I, Heldt HW** (1993) On the function of mitochondrial metabolism during photosynthesis in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves (partitioning between respiration and export of redox equivalents and precursors for nitrate assimilation products). *Plant Physiology* **103**: 1147–1154
- Hanson AD, Cane DA, Shachar-Hill Y** (2000) Plant one-carbon metabolism and its engineering. *Trends in Plant Science* **5**: 206–213
- Hanson AD, Gregory JF** (2011) Folate Biosynthesis, Turnover, and Transport in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 105–125
- Hardy RC, Cottingham RL** (1949) Viscosity of deuterium oxide and water in the range of 5° to 125°C. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **42** : 573–578
- He Y, Gan S** (2002) A Gene Encoding an Acyl Hydrolase Is Involved in Leaf Senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**: 805–815
- Heineke D, Riens B, Grosse H, Hoferichter P, Peter U, Flüge U-I, Heldt HW** (1991) Redox transfer across the inner chloroplast envelope membrane. *Plant Physiology* **95**: 1131–1137
- Hermes JD, Morrical SW, O'Leary MH, Cleland WW** (1984) Variation Variation of transition-state structure as a function of the nucleotide in reactions catalyzed by dehydrogenases. 2. Formate dehydrogenase. *Biochemistry* **23**: 5479–5488
- Hesse H, Kreft O, Maimann S, Zeh M, Hoefgen R** (2004) Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **55**: 1799–1808



- Hodges M** (2002) Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *Journal of Experimental Botany* **53**: 905–916
- Hodges M, Cornic G, Briantais J-M** (1989) Chlorophyll fluorescence from spinach leaves: resolution of non-photochemical quenching. *Biochimica et Biophysica Acta* **974**: 289–293
- Hodges M, Jossier M, Boex-Fontvieille E, Tcherkez G** (2013) Protein phosphorylation and photorespiration. *Plant Biology* **15**: 694–706
- Hodges M, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Jacquot J-P, Stein M, Lepiniec L, Crétin C, Gadal P** (1994) Purification and characterization of pea thioredoxin f expressed in *Escherichia coli*. *Plant Molecular Biology* **26**: 225–234
- Hondred D, Wadle D-M, Titus DE, Becker WM** (1987) Light-stimulated accumulation of the peroxisomal enzymes hydroxypyruvate reductase and serine: glyoxylate aminotransferase and their translatable mRNAs in cotyledons of cucumber seedlings. *Plant Molecular Biology* **9**: 259–275
- Horton P, Ruban AV, Walters RG** (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Biology* **47**: 655–684

## I

- Igamberdiev AU, Bykova NV, Lea PJ, Gardeström P** (2001) The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: A study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiologia Plantarum* **4**: 427–438
- Igamberdiev AU, Gardeström P** (2003) Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1606**: 117–125
- Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C** (2003) Identification of photorespiratory glutamate: glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**: 975–987
- Igarashi D, Tsuchida H, Miyao M, Ohsumi C** (2006) Glutamate:Glyoxylate Aminotransferase Modulates Amino Acid Content during Photorespiration. *Plant Physiology* **142**: 901–910
- Issakidis E, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Jacquot J-P, Crétin C, Gadal P** (1992) Site-directed mutagenesis reveals the involvement of an additional thioredoxin-dependent regulatory site in the activation of recombinant *Sorghum* leaf NADP-Malate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 21577–21583
- Izumi M, Tsunoda H, Suzuki Y, Makino A, Ishida H** (2012) RBCS1A and RBCS3B, two major members within the *Arabidopsis* RBCS multigene family, function to yield sufficient Rubisco content for leaf photosynthetic capacity. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2159–2170

## J

- Jacquot J-P, Lopez-Jaramillo J, Chueca A, Cherfils J, Lemaire S, Chedozeau B, Miginiac-Maslow M, Decottignies P, Wolosiuk R, Lopez-Gorge J** (1995) High-level expression of recombinant pea chloroplast fructose-1, 6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *European Journal of Biochemistry* **229**: 675–681
- Jamai A, Salome PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR** (2009) Arabidopsis Photorespiratory Serine Hydroxymethyltransferase Activity Requires the Mitochondrial Accumulation of Ferredoxin-Dependent Glutamate Synthase. *The Plant Cell* **21**: 595–606
- Johnson GN** (2011) Physiology of PSI cyclic electron transport in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1807**: 384–389

- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ** (2000) Identification and characterization of HAOX1, HAOX2, and HAOX3, three human peroxisomal 2-hydroxy acid oxidases. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 12590–12597
- Joshi V, Laubengayer KM, Schauer N, Fernie AR, Jander G** (2006) Two Arabidopsis Threonine Aldolases Are Nonredundant and Compete with Threonine Deaminase for a Common Substrate Pool. *The Plant Cell* **18**: 3564–3575
- Jossier M, Bouly JP, Meimoun P, Ajrmand A, Lessard P, Hawley S, Grahame Hardie D, Thomas M** (2009) SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signaling in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **59**: 316–328

## K

- Kanazawa A, Kramer DM** (2002) In vivo modulation of nonphotochemical exciton quenching (NPQ) by regulation of chloroplast ATP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 12789–12794
- Kebeish R, Niessen M, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch H-J, Rosenkranz R, Stäbler N, Schönfeld B, Kreuzaler F, Peterhänsel C** (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* **25**: 593–599
- Keech O, Pesquet E, Gutierrez L, Ahad A, Bellini C, Smith SM, Gardestrom P** (2010) Leaf Senescence Is Accompanied by an Early Disruption of the Microtubule Network in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**: 1710–1720
- Kendall AC, Wallsgrave RM, Hall NP, Turner JC, Lea PJ** (1986) Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* **168**: 316–323
- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ** (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* **275**: 741–743
- Kleinboelting N, Huep G, Kloetgen A, Viehoveer P, Weisshaar B** (2012) GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* **40**: 1211–1215
- Knight J, Hinsdale M, Holmes R** (2012) Glycolate and 2-phosphoglycolate content of tissues measured by ion chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **421**: 121–124
- Kocacinar F, Mckown AD, Sage TL, Sage RF** (2008) Photosynthetic pathway influences xylem structure and function in *Flaveria* (Asteraceae). *Plant, Cell & Environment* **31**: 1363–1376
- Krapp A, David LC, Chardin C, Girin T, Marmagne A, Leprince A-S, Chaillou S, Ferrario-Mery S, Meyer C, Daniel-Vedele F** (2014) Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**: 789–798
- Kuhn A, Engqvist M, Jansen E, Weber APM, Jakobs C, Maurino VG** (2013) D-2-hydroxyglutarate metabolism is linked to photorespiration in the *shml-1* mutant. *Plant Biology* **15**: 776–784
- Kurtz KA, Rishavy MA, Cleland WW, Fitzpatrick PF** (2000) Nitrogen Isotope Effects As Probes of the Mechanism of D-Amino Acid Oxidase. *Journal of American Chemical Society* **122**: 12896–12897



## L

- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Laisk A, Edwards GE** (1998) Oxygen and electron flow in C4 photosynthesis: Mehler reaction, photorespiration and CO2 concentration in the bundle sheath. *Planta* **205**: 632–645
- Laisk A, Sumberg A** (1994) Partitioning of the leaf CO2 exchange into components using CO2 exchange and fluorescence measurements. *Plant Physiology* **106**: 689–695
- Lancien M, Ferrario-Méry S, Roux Y, Bismuth E, Masclaux C, Hirel B, Gadal P, Hodges M** (1999) Simultaneous expression of NAD-dependent isocitrate dehydrogenase and other krebs cycle genes after nitrate resupply to short-term nitrogen-starved tobacco. *Plant Physiology* **120**: 717–726
- Lancien M, Martin M, Hsieh MH, Leustek T, Goodman H, Coruzzi GM** (2002) Arabidopsis glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *The Plant Journal* **29**: 347–358
- Launay A** “Recherche de suppresseurs de la toxicité induite chez *Arabidopsis thaliana* par l’effecteur de type 3 DspA/E et étude du stress oxydant au cours de l’infection”, Thèse de doctorat en biologie, Université Paris-Sud, 2014
- Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis-Bourguet E** (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genetics* **51**: 343–365
- Liepmann AH, Olsen LJ** (2001) Peroxisomal alanine: glyoxylate aminotransferase (AGT1) is a photorespiratory enzyme with multiple substrates in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **25**: 487–498
- Liepmann AH, Olsen LJ** (2003) Alanine Aminotransferase Homologs Catalyze the Glutamate:Glyoxylate Aminotransferase Reaction in Peroxisomes of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **131**: 215–227
- Lillo C** (2008) Signalling cascades integrating light-enhanced nitrate metabolism. *Biochemical Journal* **415**: 11
- Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MAJ, Hanson MR** (2014) A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature* **513**: 547–550
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **137**: 921–930
- Lindqvist Y, Brändén C-I** (1985) Structure of glycolate oxidase from spinach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 6855–6859
- Lindqvist Y, Brändén CI** (1989) The active site of spinach glycolate oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 3624–3628
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, Lemaitre T, Azzopardi M, Morin H, Chardon F, Reisdorf-Cren M, Avice J-C, Masclaux-Daubresse C** (2011) The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1375–1390
- Lu Y, Li Y, Yang Q, Zhang Z, Chen Y, Zhang S, Peng X-X** (2013) Suppression of glycolate oxidase causes glyoxylate accumulation that inhibits photosynthesis through deactivating Rubisco in rice. *Physiologia Plantarum* **150**: 463–476
- Ludewig U, Neuhaus B, Dynowski M** (2007) Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Letters* **581**: 2301–2308

- Luo B, Groenke K, Takors R, Wandrey C, Oldiges M** (2007) Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **59**: 826–839

## M

- Ma C, Reumann S** (2008) Improved prediction of peroxisomal PTS1 proteins from genome sequences based on experimental subcellular targeting analyses as exemplified for protein kinases from *Journal of Experimental Botany* **59**: 3767–3779
- Macheroux P, Kieweg V, Massey V, Söderlind E, Stenberg K, Lindqvist Y** (1993) Role of tyrosine 129 in the active site of spinach glycolate oxidase. *European Journal of Biochemistry* **213**: 1047–1054
- Macheroux P, Massey V, Thiele DJ, Volokita M** (1991) Expression of spinach glycolate oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*: purification and characterization. *Biochemistry* **30**: 4612–4619
- Maier A, Fahnenstich H, von Caemmerer S, Engqvist MKM, Weber APM, Flügge U-I, Maurino VG** (2012) Transgenic Introduction of a Glycolate Oxidative Cycle into *A. thaliana* Chloroplasts Leads to Growth Improvement. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2012.00038
- Maurino VG, Weber APM** (2013) Engineering photosynthesis in plants and synthetic microorganisms. *Journal of Experimental Botany* **64**: 743–751
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659–668
- McClung CR, Hsu M, Painter JE, Gagne JM, Karlsberg SD, Salomé PA** (2000) integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase. *Plant Physiology* **123**: 381–391
- Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, Queval G, Han Y, Taconnat L, Saindrenan P, Gouia H, Issakidis-Bourguet E, Renou J-P, et al** (2010) *Arabidopsis* GLUTATHIONE REDUCTASE1 Plays a Crucial Role in Leaf Responses to Intracellular Hydrogen Peroxide and in Ensuring Appropriate Gene Expression through Both Salicylic Acid and Jasmonic Acid Signaling Pathways. *Plant Physiology* **153**: 1144–1160
- Milligan BG** (1998) Total DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. *Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press*. pp. 29–64. *Molecular Genetic Analysis of Population: A Practical Approach*, 2<sup>nd</sup> Edition.
- Müh U, Williams CH Jr, Massey V** (1994) Lactate monooxygenase II. Site directed mutagenesis of the postulated active site base histidine 290. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 7989–7993
- Mulligan M, Wilson B, Tolbert NE** (1983) Effects of glyoxylate on photosynthesis by intact chloroplasts. *Plant Physiology* **72**: 415–429
- Murashige T and Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473–497

## N

- Nath K, Jajoo A, Poudyal RS, Timilsina R, Park YS, Aro E-M, Nam HG, Lee C-H** (2013) Towards a critical understanding of the photosystem II repair mechanism and its regulation during stress conditions. *FEBS Letters* **587**: 3372–3381

- Navarre DA, Wolpert TJ** (1995) Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin victorin. *The Plant Cell* **7**: 463–471
- Nelson CJ, Alexova R, Jacoby RP, Millar AH** (2014) Proteins with High Turnover Rate in Barley Leaves Estimated by Proteome Analysis Combined with in Planta Isotope Labeling. *Plant Physiology* **166**: 91–108
- Neuburger M, Rébeillé F, Jourdain A, Nakamura S, Douce R** (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 9466–9472
- Newman M-A, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G** (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2013.00139
- Nishimura M, Akhmedov YD, Strzalka K, Akazawa T** (1983) Purification and characterization of glycolate oxidase from pumpkin cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **222**: 397–402
- Noctor G, Bergot G, Mauve C, Thominet D, Lelarge-Trouverie C, Prioul J-L** (2007) A comparative study of amino acid measurement in leaf extracts by gas chromatography-time of flight-mass spectrometry and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Metabolomics* **3**: 161–174
- Nölke G, Houdelet M, Kreuzaler F, Peterhänsel C, Schillberg S** (2014) The expression of a recombinant glycolate dehydrogenase polyprotein in potato (*Solanum tuberosum*) plastids strongly enhances photosynthesis and tuber yield. *Plant Biotechnology Journal* **12**: 734–742

## O

- Okinaka Y, Yang CH, Herman E, Kinney A, Keen NT** (2002) The P34 syringolide elicitor receptor interacts with a soybean photorespiration enzyme, NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Molecular Plant Microbe Interactions* **15**: 1213–1218
- Orea A, Pajuelo P, Pajuelo E, Quidiello C, Romero JM, Márquez AJ** (2002) Isolation of photorespiratory mutants from *Lotus japonicus* deficient in glutamine synthetase. *Physiologia Plantarum* **115**: 352–361
- Ortega-Galisteo AP, Rodriguez-Serrano M, Pazmino DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC** (2012) S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **63**: 2089–2103

## P

- Palmieri MC, Lindermayr C, Bauwe H, Steinhauser C, Durner J** (2010) Regulation of Plant Glycine Decarboxylase by S-Nitrosylation and Glutathionylation. *Plant Physiology* **152**: 1514–1528
- Parry MAJ, Andralojc PJ, Scales JC, Salvucci ME, Carmo-Silva AE, Alonso H, Whitney SM** (2013) Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement. *Journal of Experimental Botany* **64**: 717–730
- Parry MAJ, Keys AJ, Madgwick PJ, Carmo-Silva AE, Andralojc PJ** (2008) Rubisco regulation: a role for inhibitors. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1569–1580
- Pennati A, Gadda G** (2009) Involvement of Ionizable Groups in Catalysis of Human Liver Glycolate Oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 31214–31222
- Pennati A, Gadda G** (2011) Stabilization of an Intermediate in the Oxidative Half-Reaction of Human Liver Glycolate Oxidase. *Biochemistry* **50**: 1–3

- Peterhansel C, Krause K, Braun HP, Espie GS, Fernie AR, Hanson DT, Keech O, Maurino VG, Mielewczik M, Sage RF** (2013) Engineering photorespiration: current state and future possibilities. *Plant Biology* **15**: 754–758
- Peterson RB, Havir EA** (2001) Photosynthetic properties of an *Arabidopsis thaliana* mutant possessing a defective *PsbS* gene. *Planta* **214**: 142–152
- Pick TR, Brautigam A, Schulz MA, Obata T, Fernie AR, Weber APM** (2013) PLGG1, a plastidic glycolate glycerate transporter, is required for photorespiration and defines a unique class of metabolite transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 3185–3190
- Pilgrim ML, Caspar T, Quail PH, McClung CR** (1993) Circadian and light-regulated expression of nitrate reductase in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **23**: 349–364
- Pollegioni L, Blodig W, Ghisla S** (1997) On the mechanism of D-amino acid oxidase: structure/linear free energy correlations and deuterium kinetic isotope effects using substituted phenylglycine. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 4924–4934
- Popov VN, Dmitrieva EA, Eprintsev AT, Igamberdiev AU** (2003) Glycolate oxidase isoforms are distributed between the bundle sheath and mesophyll tissues of maize leaves. *Russian Journal of Plant Physiology* **160**: 851–857
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* **975**: 384–394
- Pruzinska A, Tanner G, Aubry S, Anders I, Moser S, Müller T, Ongania K-H, Kräutler B, Youn J-Y, Liljegren SJ, Hörtensteiner S** (2005) Chlorophyll Breakdown in Senescent *Arabidopsis* Leaves. Characterization of Chlorophyll Catabolites and of Chlorophyll Catabolic Enzymes Involved in the Degreening Reaction. *Plant Physiology* **139**: 52–63

## Q

- Quaye O, Lountos GT, Fan F, Orville AM, Gadda G** (2008) Role of Glu312 in binding and positioning of the substrate for the hydride transfer reaction in choline oxidase. *Biochemistry* **47**: 243–56
- Quesada A, Gomez-Garcia I, Fernandez E** (2000) Involvement of chloroplast and mitochondria redox valves in nitrate assimilation. *Trends in Plant Science* **5**: 463–464
- Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoeberichts FA, Vandenborgh M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G** (2007) Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *The Plant Journal* **52**: 640–657
- Quick WP, Schurr U, Fitchner K, Schulze ED, Rodermeier SR, Bgorad L, Stitt M** (1991) The impact of decreased RuBisCO on photosynthesis, growth, allocation and storage in tobacco plants which have been transformed with antisense *rbcS*. *The Plant Journal* **1**: 51–58

## R

- Rachmilevitch S, Cousins AB, Bloom AJ** (2004) Nitrogen assimilation in plant shoots depends on photorespiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 11506–11510

- Ralph EC, Anderson MA, Cleland WW, Fitzpatrick PF** (2006) Mechanistic Studies of the Flavoenzyme Tryptophan 2-Monooxygenase: Deuterium and  $^{15}\text{N}$  Kinetic Isotope Effects on Alanine Oxidation by an L-Amino Acid Oxidase. *Biochemistry* **45**: 15844–15852
- Ralph EC, Hirschi JS, Anderson MA, Cleland WW, Singleton DA, Fitzpatrick PF** (2007) Insights into the Mechanism of Flavoprotein-Catalyzed Amino Oxidation from Nitrogen Isotope Effects on the Reaction of NMethyltryptophan Oxidase. *Biochemistry* **46**: 7655–7664
- Rendina AR, Hermes JD, Cleland WW** (1984) Use of multiple isotope effects to study the mechanism of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochemistry* **23**: 6257–6262
- Renné P, Dreßen U, Hebbeker U, Hille D, Flügge U-I, Westhoff P, Weber APM** (2003) The *Arabidopsis* mutant *dct* is deficient in the plastidic glutamate/malate translocator DiT2. *The Plant Journal* **35**: 316–331
- Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, Antonicelli GE, Rasche N, Lüder F, Weckwerth W, Jahn O** (2007) Proteome Analysis of *Arabidopsis* Leaf Peroxisomes Reveals Novel Targeting Peptides, Metabolic Pathways, and Defense Mechanisms. *The Plant Cell* **19**: 3170–3193
- Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, Holbrook D, Linka N, Switzenberg R, Wilkerson CG, Weber AP, Olsen LJ, Hu J** (2009) In-depth proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiology* **150**: 125–143
- Richardson KE, Tolbert NE** (1961) TOxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **236**: 1280–1284
- Roberts IN, Caputo C, Criado MV, Funk C** (2012) Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* **145**: 130–139
- Rocha MJ, Rocha E, Resende AD, Lobo-da-Cunha A** (2003) Measurement of peroxisomal enzyme activities in the liver of brown trout (*Salmo trutta*), using spectrophotometric methods. *BMC Biochemistry* **4**: 2
- Rojas C, Mysore KS** (2012) Glycolate oxidase is an alternative source for  $\text{H}_2\text{O}_2$  production during plant defense responses and functions independently from NADPH oxidase. *Plant Signal and Behavior* **7**: 752–755
- Rojas CM, Senthil-Kumar M, Wang K, Ryu C-M, Kaundal A, Mysore KS** (2012) Glycolate Oxidase Modulates Reactive Oxygen Species-Mediated Signal Transduction during Nonhost Resistance in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**: 336–352
- Roje S** (2006) S-Adenosyl-L-methionine: Beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* **67**: 1686–1698
- Ros R, Muñoz-Bertomeu J, Krueger S** (2014) Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends in Plant Science* **19**: 564–569
- Rott M, Martins NF, Thiele W, Lein W, Bock R, Kramer DM, Schottler MA** (2011) ATP Synthase Repression in Tobacco Restricts Photosynthetic Electron Transport,  $\text{CO}_2$  Assimilation, and Plant Growth by Overacidification of the Thylakoid Lumen. *The Plant Cell* **23**: 304–321
- Ruan Y-L** (2014) Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 33–67

---

## S

- Sage RF, Khoshravesh R, Sage TL** (2014) From proto-Kranz to  $\text{C}_4$  Kranz: building the bridge to  $\text{C}_4$  photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**: 3341–3356



- Scharschmidt M, Fisher MA, Cleland WW** (1984) Variation of transition-state structure as a function of the nucleotide in reactions catalyzed by dehydrogenases. 1. Liver alcohol dehydrogenase with benzyl alcohol and yeast aldehyde dehydrogenase with benzaldehyde. *Biochemistry* **23**: 5471-5478
- Schertl P, Braun H-P** (2014) Respiratory electron transfer pathways in plant mitochondria. *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2014.00163
- Schippers JH** (2015) Transcriptional networks in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology* **27**: 77–83
- Schneidereit J, Häusler RE, Fiene G, Kaiser WM, Weber APM** (2006) Antisense repression reveals a crucial role of the plastidic 2-oxoglutarate/malate translocator DiT1 at the interface between carbon and nitrogen metabolism. *The Plant Journal* **45**: 206–224
- Schürmann P, Jacquot J-P** (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annual Review of Plant Biology* **51**: 371–400
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D** (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**: 1121–1133
- Schwarte S, Bauwe H** (2007) Identification of the Photorespiratory 2-Phosphoglycolate Phosphatase, PGLP1, in Arabidopsis. *Plant Physiology* **144**: 1580–1586
- Seltmann MA, Stingl NE, Lautenschlaeger JK, Krischke M, Mueller MJ, Berger S** (2010) Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **152**: 1940–1950
- Seo YS, Chern M, Bartley LE, Han M, Jung KH, Lee I, Walia H, Richter T, Xu X, Cao P, Bai W, Ramanan R, Amonpant F, Arul L, Canlas PE, Ruan R, Park CJ, Chen X, Hwang S, Jeon JS, Ronald PC** (2011) Towards establishment of a rice stress response interactome. *PLoS Genetics* **4** : doi: 10.1371/journal.pgen.1002020.
- Servaites JC, Ogren WL** (1977) Chemical inhibition of the glycolate pathway in soybean leaf cells. *Plant Physiology* **60**: 461–466
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, Mc Elver J, Patton D, Dietrich B, Ho P, Bacwaden J, Ko C, Clarke JD, Cotton D, Bullis D, Snell J, Miguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mitzel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff SA** (2002) A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *The Plant Cell* **14**: 2985–2994
- Sicher R** (2013) Combined effects of CO<sub>2</sub> enrichment and elevated growth temperatures on metabolites in soybean leaflets: evidence for dynamic changes of TCA cycle intermediates. *Planta* **238**: 369–380
- Singh J, Pandey P, James D, Chandrasekhar K, Achary VMM, Kaul T, Tripathy BC, Reddy MK** (2014) Enhancing C<sub>3</sub> photosynthesis: an outlook on feasible interventions for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal* **12**: 1217–1230
- Sobrado P, Daubner CS, Fitzpatrick PF** (2001) Probing the Relative Timing of Hydrogen Abstraction Steps in the Flavocytochrome<sub>b2</sub> Reaction with Primary and Solvent Deuterium Isotope Effects and Mutant Enzymes. *Biochemistry* **40**: 994-1001
- Sobrado P, Fitzpatrick PF** (2003) Solvent and primary deuterium isotope effects show that lactate CH and OH bond cleavages are concerted in Y254F flavocytochrome b<sub>2</sub>. consistent with a hybriide transfer mechanism. *Biochemistry* **42** : 15208-15214
- Somerville CR, Ogren WL** (1979) A phosphoglycolate phosphatase-deficient mutant of Arabidopsis. Mutants of the cruciferous plant Arabidopsis thaliana lacking glycine decarboxylase activity. *Nature* **280**: 833–835
- Somerville CR, Ogren WL** (1980a) Inhibition of photosynthesis in Arabidopsis mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* **286**: 257–259
- Somerville CR, Ogren WL** (1980b) Photorespiration mutants of Arabidopsis thaliana deficient in serine-glyoxylate aminotransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 2684–2687

- Somerville CR, Ogren WL** (1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiology* **67**: 666–671
- Somerville CR, Ogren WL** (1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochemical J* **202**: 373–380
- Somerville CR, Ogren WL** (1983) An *Arabidopsis thaliana* mutant defective in chloroplast dicarboxylate transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 1290–1294
- Sparla F, Zaffagnini M, Wedel N, Scheibe R, Pupillo P, Trost P** (2005) Regulation of Photosynthetic GAPDH Dissected by Mutants. *Plant Physiology* **138**: 2210–2219
- Spreitzer RJ, Salvucci ME** (2002) R UBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 449–475
- Srinivasan R, Oliver DJ** (1995) Light-dependent and tissue-specific expression of the H-protein of the glycine decarboxylase complex. *Plant Physiology* **109**: 161–168
- Stenberg K, Clausen T, Lindqvist Y, Macheroux P** (1995) Involvement of Tyr24 and Trp108 in substrate binding and substrate specificity of glycolate oxidase. *European Journal of Biochemistry* **228**: 408–416
- Stenberg K, Lindqvist Y** (1996) High-Level Expression, Purification, and Crystallization of Recombinant Spinach Glycolate Oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **8**: 295–298
- Stenberg K, Lindqvist Y** (1997) Three-dimensional structures of glycolate oxidase with bound active-site inhibitors. *Protein Science* **6**: 1009–1015
- Sudo E, Suzuki Y, Makino A** (2014) Whole-Plant Growth and N Utilization in Transgenic Rice Plants with Increased or Decreased Rubisco Content under Different CO<sub>2</sub> Partial Pressures. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1905–1911
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science* **15**: 462–470

## T

- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig R** (2004) *Arabidopsis thaliana* GLN2-Encoded Glutamine Synthetase Is Dual Targeted to Leaf Mitochondria and Chloroplasts. *The Plant Cell* **16**: 2048–2058
- Takahashi S, Bauwe H, Badger M** (2007) Impairment of the Photorespiratory Pathway Accelerates Photoinhibition of Photosystem II by Suppression of Repair But Not Acceleration of Damage Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **144**: 487–494
- Takeda M, Jee J, Ono AM, Terauchi T, Kainosho M** (2009) Hydrogen exchange rate of tyrosine hydroxyl groups in proteins as studied by the deuterium isotope effect on C chemical shift. *Journal of American Chemical Society* **131** : 18556–18562
- Taniguchi M, Taniguchi Y, Kawasaki M, STakeda S, Kato T, Sato S, Tabata S, Miyake H, Sgiyama T** (2002) Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **43**: 706–717
- Taylor TC, Andersson I** (1997) The structure of the complex between rubisco and its natural substrate ribulose 1, 5-bisphosphate. *Journal of Molecular Biology* **265**: 432–444
- Tcherkez G, Bligny R, Gout E, Mahé A, Hodges M, Cornic G** (2008) Respiratory metabolism of illuminated leaves depends on CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 797–802
- Tcherkez G, Farquhar G, John Andrews T** (2006) Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose biphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 7246–7251



- Tcherkez G, Mahe A, Gauthier P, Mauve C, Gout E, Bligny R, Cornic G, Hodges M** (2009) In Folio Respiratory Fluxomics Revealed by  $^{13}\text{C}$  Isotopic Labeling and H/D Isotope Effects Highlight the Noncyclic Nature of the Tricarboxylic Acid “Cycle” in Illuminated Leaves. *Plant Physiology* **151**: 620–630
- Tcherkez G, Mahé A, Hodges M** (2011)  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  fractionations and plant metabolism. *Trends in Plant Science* **16**: 499–506
- Tcherkez GG, Bathelier C, Stuart-Williams H, Whitney S, Gout E, Bligny R, Badger M, Farquhar GD** (2013)  $\text{D}_2\text{O}$  solvent isotope effects suggest uniform energy barriers in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase catalysis. *Biochemistry* **52**: 869–877
- Thelen JJ, Miernyk JA, Randall DD** (1998) Partial purification and characterization of the maize mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Plant Physiology* **116**: 1443–1450
- Thelen JJ, Miernyk JA, Randall DD** (2000) Pyruvate dehydrogenase kinase from *Arabidopsis thaliana*: a protein histidine kinase that phosphorylates serine residues. *The Biochemical Journal* **349**: 195–201
- Timm S, Bauwe H** (2013) The variety of photorespiratory phenotypes – employing the current status for future research directions on photorespiration. *Plant Biology* **15**: 737–747
- Timm S, Florian A, Arrivault S, Stitt M, Fernie AR, Bauwe H** (2013b) Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Letters* **586**: 3692–3697
- Timm S, Florian A, Jahnke K, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Bauwe H** (2011) The Hydroxypyruvate-Reducing System in *Arabidopsis*: Multiple Enzymes for the Same End. *Plant Physiology* **155**: 694–705
- Timm S, Florian A, Wittmiss M, Jahnke K, Hagemann M, Fernie AR, Bauwe H** (2013a) Serine Acts as a Metabolic Signal for the Transcriptional Control of Photorespiration-Related Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **162**: 379–389
- Timm S, Mielewczik M, Florian A, Frankenbach S, Dreissen A, Hocken N, Fernie AR, Walter A, Bauwe H** (2012) High-to-Low  $\text{CO}_2$  Acclimation Reveals Plasticity of the Photorespiratory Pathway and Indicates Regulatory Links to Cellular Metabolism of *Arabidopsis*. *PLoS One* **7**: e42809
- Timm S, Nunes-Nesi A, Parnik T, Morgenthal K, Wienkoop S, Keerberg O, Weckwerth W, Kleczkowski LA, Fernie AR, Bauwe H** (2008) A Cytosolic Pathway for the Conversion of Hydroxypyruvate to Glycerate during Photorespiration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**: 2848–2859
- Timm S, Wittmiß M, Gamlien S, Ewald R, Florian A, Frank M, Wirtz M, Hell R, Fernie AR, Bauwe H** (2015) Mitochondrial Dihydrolipoyl Dehydrogenase Activity Shapes Photosynthesis and Photorespiration of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **27**: 1968–1984
- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL** (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology* **141**: 373–378
- Toujani W, Munoz-Bertomeu J, Flores-Tornero M, Rosa-Tellez S, Anoman AD, Alseekh S, Fernie AR, Ros R** (2013) Functional Characterization of the Plastidial 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Family in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **163**: 1164–1178
- Tsai C-L, Gokulan K, Sobrado P, Sacchettini JC, Fitzpatrick PF** (2007) Mechanistic and Structural Studies of H373Q Flavocytochrome  $b_2$ : Effects of Mutating the Active Site Base. *Biochemistry* **46**: 7844–7851

## V

- Verhoeven NM, Wanders RJA, Poll-The BT, Saudubray J-M, Jakobs C** (1998) The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: a review. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **21**: 697–728

- Verslues PE, Kim Y-S, Zhu J-K** (2007) Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an Arabidopsis glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology* **64**: 205–217
- Vignaud C, Pietrancosta N, Williams EL, Rumsby G, Lederer F** (2007) Purification and characterization of recombinant human liver glycolate oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **465**: 410–416
- Voll LM, Jamaï A, Renné P, Voll H, McClung CR, Weber APM** (2005) The Photorespiratory Arabidopsis shm1 Mutant Is Deficient in SHM1. *Plant Physiology* **140**: 59–66

---

## W

- Wallsgrave R, Turner J, Hall N, Kendall A, Bright S** (1987) Barley mutants lacking chloroplast Glutamine synthetase - biochemical and genetic analysis. *Plant Physiology* **83**: 155–158
- Ward DA, Keys AJ** (1989) A comparison between the coupled spectrophotometric and uncoupled radiometric assays for RuBP carboxylase. *Photosynthesis Research* **22**: 167–171
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, Erban A, Giavalisco P, Kopka J, Mueller-Roeber B, Fernie AR, Hoefgen R** (2013) Comprehensive Dissection of Spatiotemporal Metabolic Shifts in Primary, Secondary, and Lipid Metabolism during Developmental Senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**: 1290–1310
- Williams HE, Smith LH Jr** (1968) Disorders of oxalate metabolism. *American Journal of Medicine*. **45**:715-35
- Williams HW, Eichler E, Randall WC, Rooney CS, Cragoe EJ Jr, Streeter KB, Schwam H, Michelson SR, Patchett AA, Taub D** (1983) Inhibitors of glycolic acid oxidase. 4-Substituted 2,4-dioxobutanoic acid derivatives. *Journal of Medical Chemistry* **26**: 1196-1200
- Wu J, Zhang Z, Zhang Q, Han X, Gu X, Lu T** (2015) The molecular cloning and clarification of a photorespiratory mutant, *oscdm1*, using enhancer trapping. *Frontiers in Genetics* doi: 10.3389/fgene.2015.00226

---

## X

- Xu G, Fan X, Miller AJ** (2012) Plant Nitrogen Assimilation and Use Efficiency. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 153–182
- Xu H, Zhang J, Zeng J, Jiang L, Liu E, Peng C, He Z, Peng X** (2009) Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1799–1809

---

## Y

- Yamaguchi K, Nishimura M** (2000) Reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation. *Plant and Cell Physiology* **41**: 1397–1406

## Z

- Zelitch I** (1973) Alternate pathways of glycolate synthesis in Tobacco and Maize leaves in relation to rates of photorespiration. *Plant Physiology* **51**: 299–305
- Zelitch I, Schultes NP, Peterson RB, Brown P, Brutnell TP** (2009) High Glycolate Oxidase Activity Is Required for Survival of Maize in Normal Air. *Plant Physiology* **149**: 195–204
- Zhang N, Portis AR** (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 9438–9443
- Zhang Z, Lu Y, Zhai L, Deng R, Jiang J, Li Y, He Z, Peng X** (2012) Glycolate Oxidase Isozymes Are Coordinately Controlled by GLO1 and GLO4 in Rice. *PLoS One* **7**: e39658
- Zhang Z, Mao X, Ou J, Ye N, Zhang J, Peng X** (2015) Distinct photorespiratory reactions are preferentially catalyzed by glutamate:glyoxylate and serine:glyoxylate aminotransferases in rice. *Journal of Photochemistry and Photobiology* **142**: 110–117
- Zhong HH, McClung CR** (1996) The circadian clock gates expression of two *Arabidopsis* catalase genes to distinct and opposite circadian phases. *Molecular and General Genetics MGG* **251**: 196–203
- Zhou F, Wu G, Deng W, Pu Y, Wei C, Li Y** (2007) Interaction of rice dwarf virus outer capsid P8 protein with rice glycolate oxidase mediates relocalization of P8. *FEBS Letter* **581**: 34–40
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R** (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 805–836

# **Annexes**

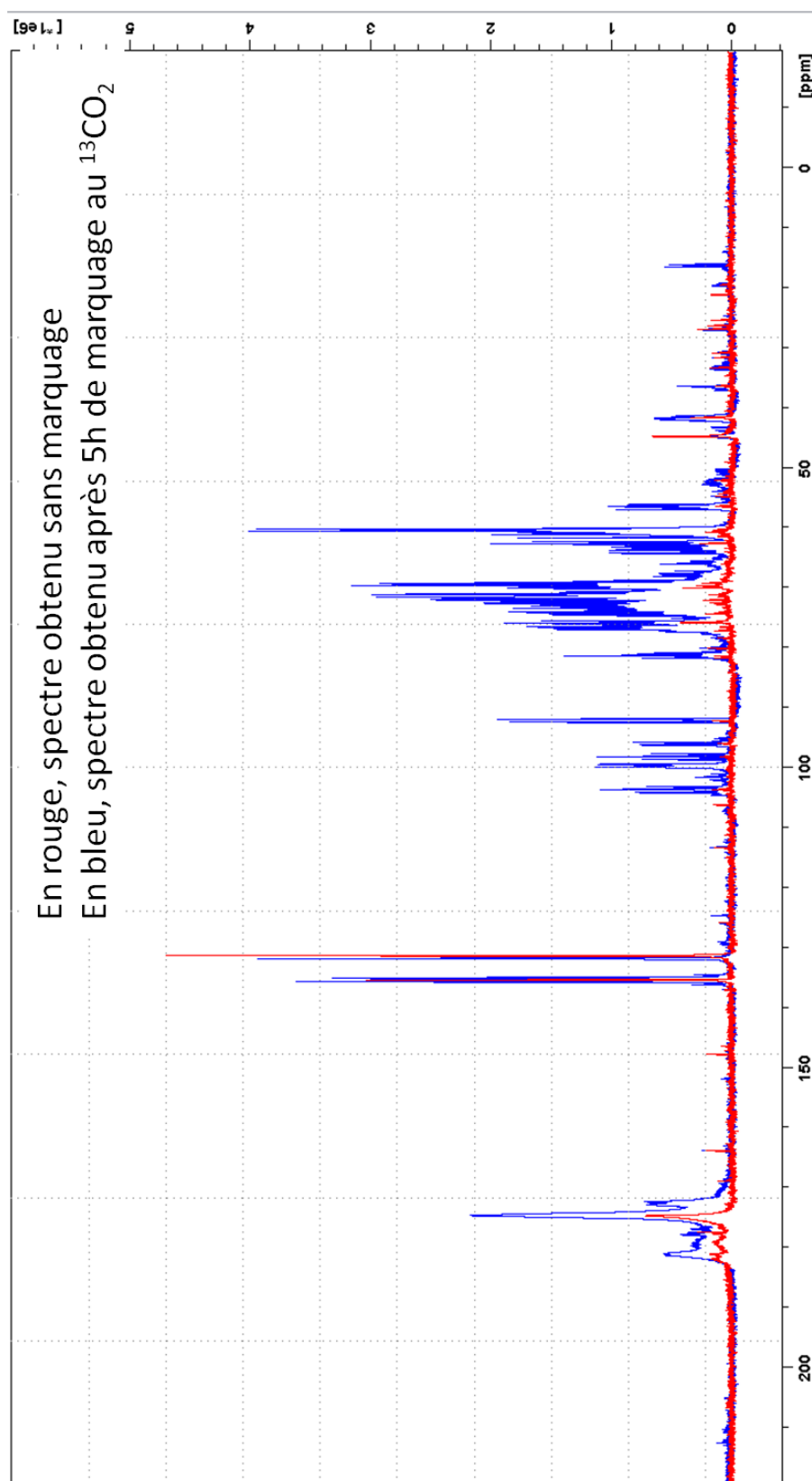
## I. Table des déplacements des positions chimiques des standards injectés en RMN du $^{13}\text{C}$

Position	déplacement chimique (ppm)
Asparagine C1	34,95
Asparagine C2	50,75
Asparagine C3	174,27
Asparagine C4	175,5
Aspartate C1	174,64
Aspartate C2	52,21
Aspartate C3	36,63
Aspartate C4	177,57
Citrate C1/C5	178,73
Citrate C2/C4	45,7
Citrate C3	75,02
Citrate C6	181,45
Fumarate C1/C4	174,55
Fumarate C2/C3	135,4
Fructose furanose C1	62,99
Fructose furanose C2	101,57
Fructose furanose C3	75,62
Fructose furanose C4	74,72
Fructose furanose C5	80,66
Fructose furanose C6	62,45
Fructose pyranose C1	63,98
Fructose pyranose C2	98,21
Fructose pyranose C3	67,65
Fructose pyranose C4	69,79
Fructose pyranose C5	69,28
Fructose pyranose C6	63,41
Glucose alpha C1	92,2
Glucose alpha C2	71,62
Glucose alpha C3	72,89
Glucose alpha C4	69,73
Glucose alpha C5	71,51
Glucose alpha C6	60,71
Glucose bêta C1	96,1
Glucose bêta C2	74,31
Glucose bêta C3	75,98
Glucose bêta C4	69,76
Glucose bêta C5	75,98
Glucose bêta C6	60,84

Position	déplacement chimique (ppm)
Glutamate C1	175
Glutamate C2	54,69
Glutamate C3	27,03
Glutamate C4	33,38
Glutamate C5	181,22
Glutamine C1	174,87
Glutamine C2	54,27
Glutamine C3	26,37
Glutamine C4	30,91
Glutamine C5	177,67
Glycine C1	172,49
Glycine C2	41,63
Glycolate C1	179,95
Glycolate C2	61,38
Malate C1	180,94
Malate C2	70,4
Malate C3	42,6
Malate C4	179,63
Maléate C2/C3	131,43
Maléate C1/C4	174,47
Sérine C1	172,38
Sérine C2	56,58
Sérine C3	60,34
Sucrose-Glucose C1	92,18
Sucrose-Glucose C2	71,16
Sucrose-Glucose C3	72,68
Sucrose-Glucose C4	69,32
Sucrose-Glucose C5	72,43
Sucrose-Glucose C6	60,22
Sucrose-Fructose C1	61,42
Sucrose-Fructose C2	103,66
Sucrose-Fructose C3	76,53
Sucrose-Fructose C4	74,11
Sucrose-Fructose C5	81,07
Sucrose-Fructose C6	62,51
Valine C1	174,98
Valine C2	60,49
Valine C3	29,14
Valine C4	16,73
Valine C5	18,01

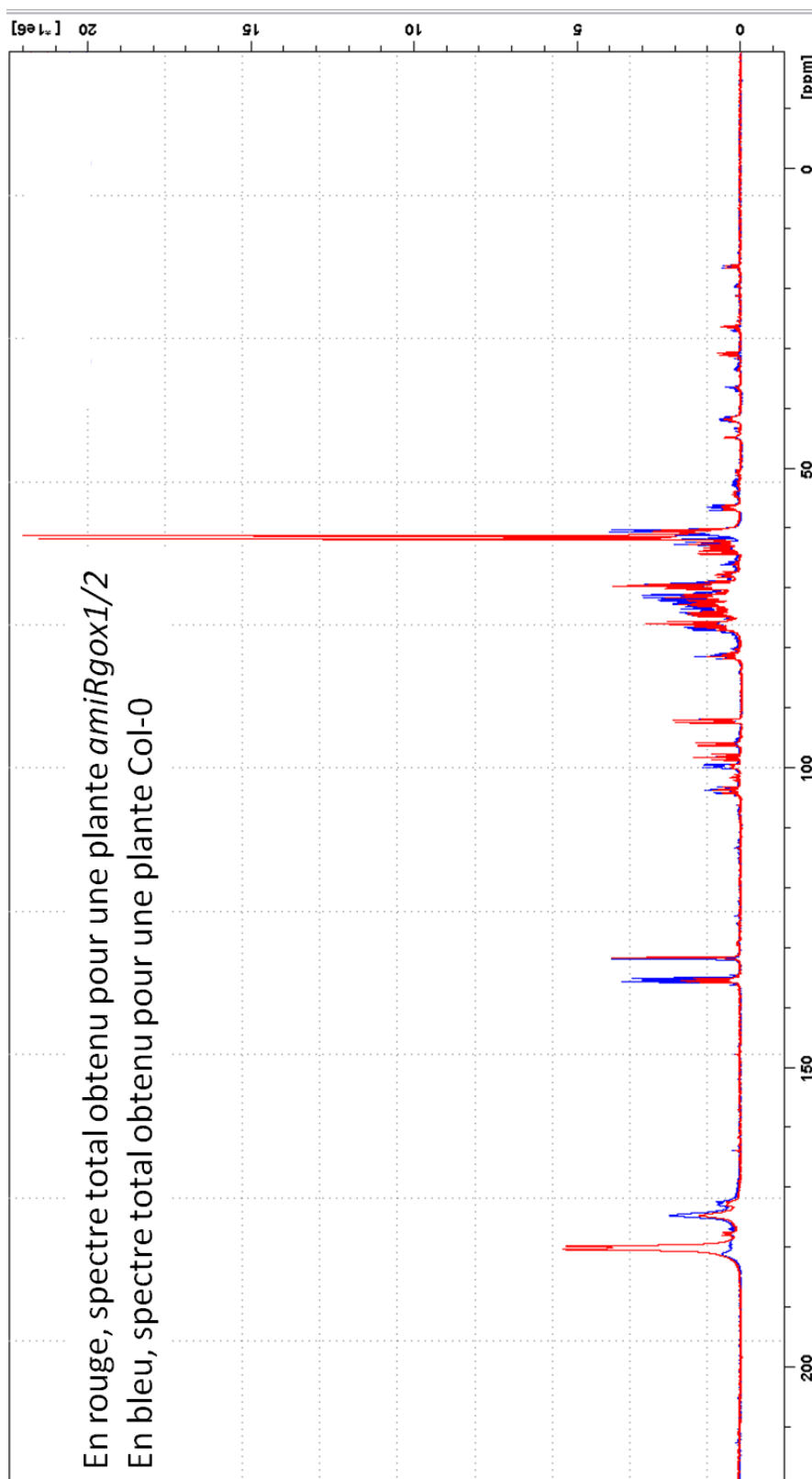
## II. Exemple de spectre obtenue en RMN du $^{13}\text{C}$

1) Exemple de l'enrichissement du spectre obtenu par RMN du  $^{13}\text{C}$  suite au marquage pendant 5h au  $^{13}\text{CO}_2$  sur une plante Col-0 pendant un transfert direct de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air



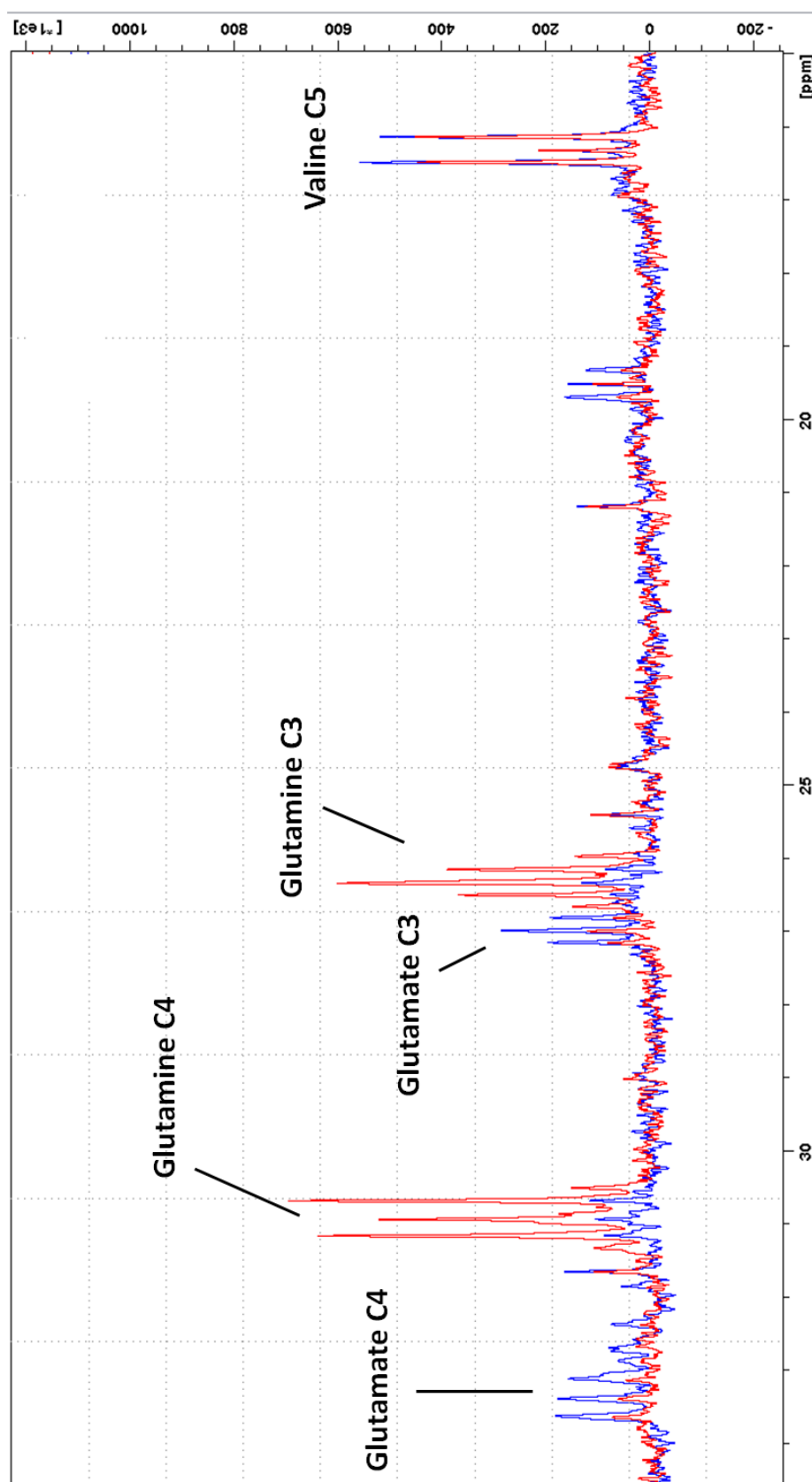
2) Comparaison des spectres obtenus par RMN du  $^{13}\text{C}$  suite au marquage pendant 5h au  $^{13}\text{CO}_2$  sur une plante Col-0 et *amiRgox1/2* pendant un transfert direct de fort  $\text{CO}_2$  dans l'air

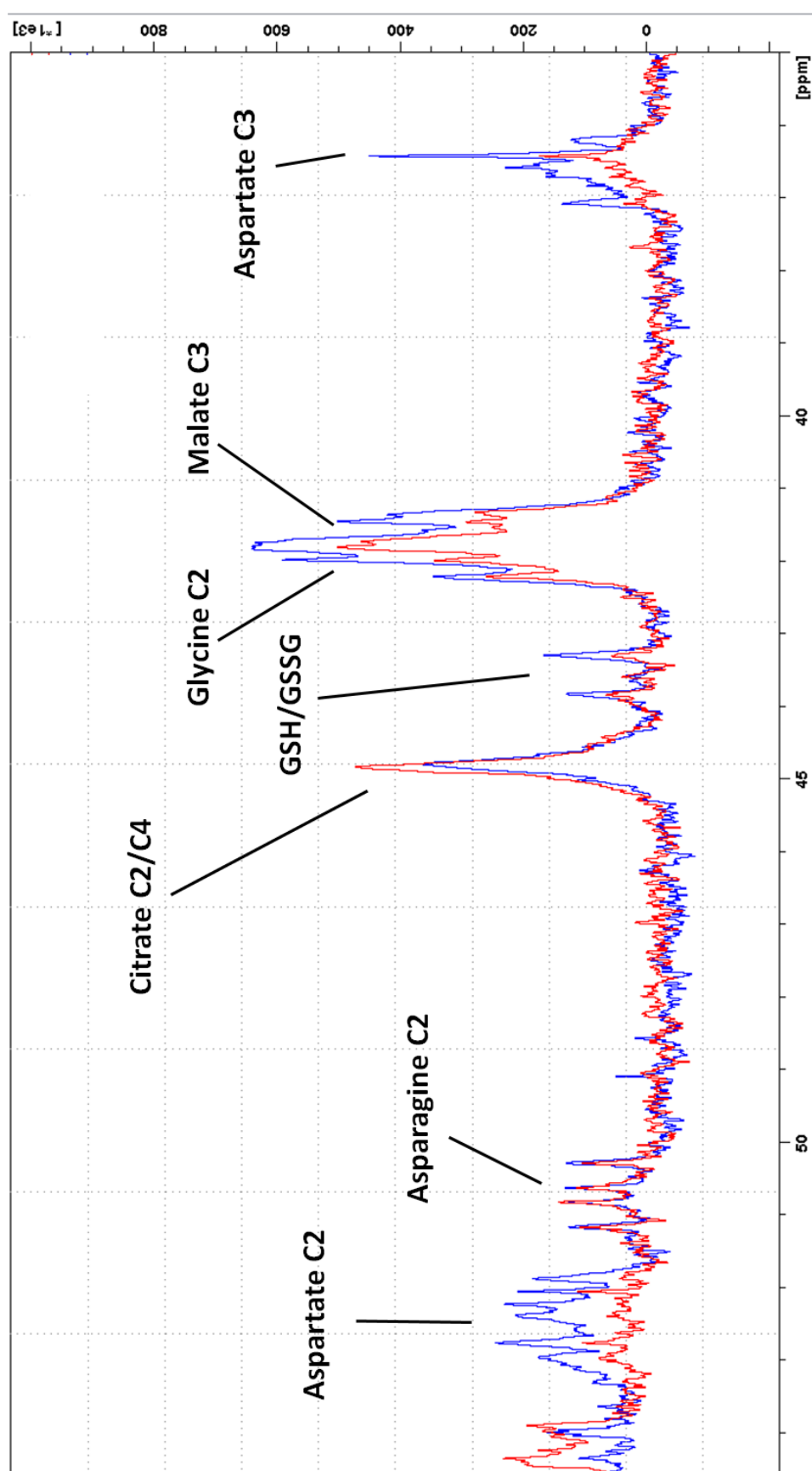
a) Spectre total

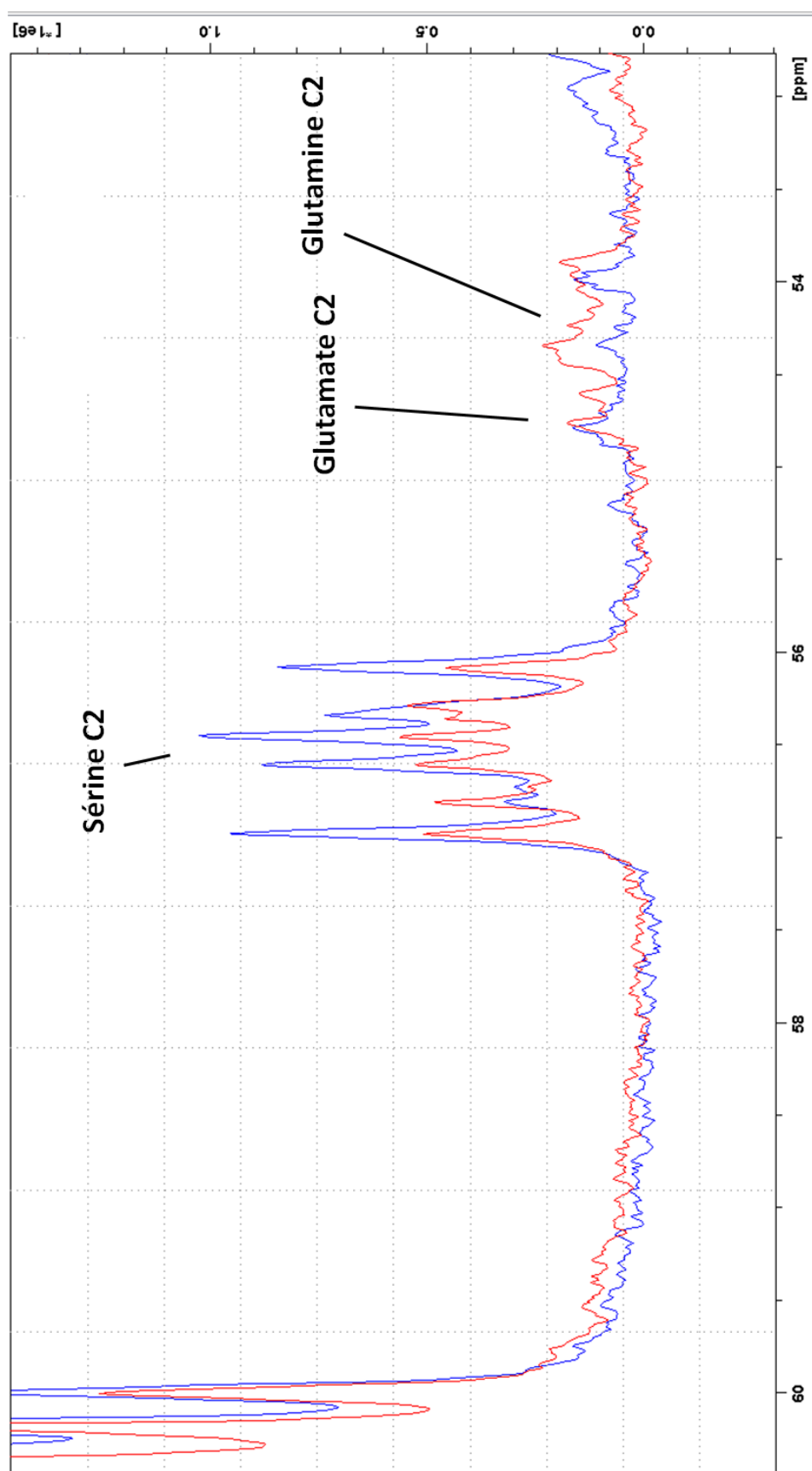


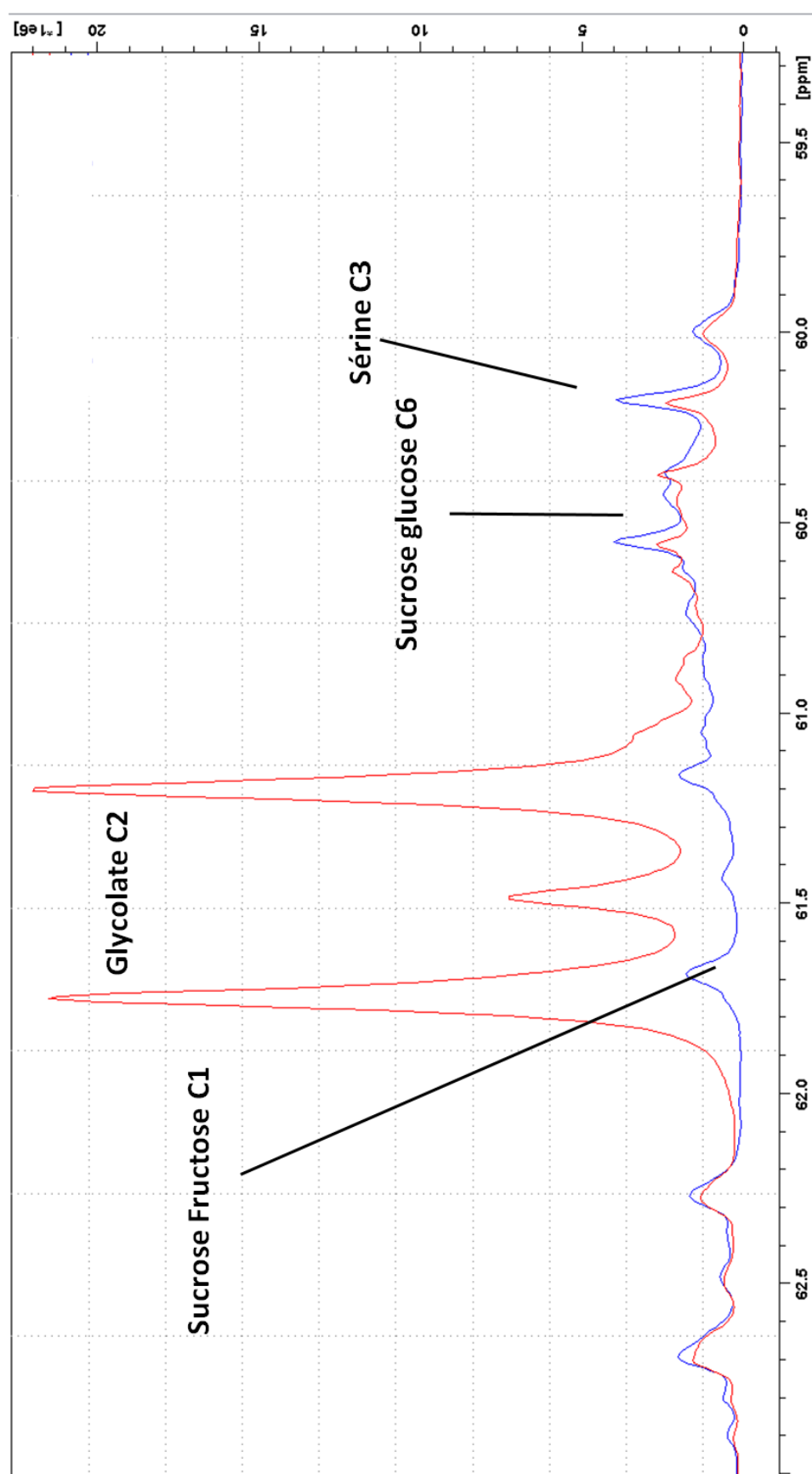


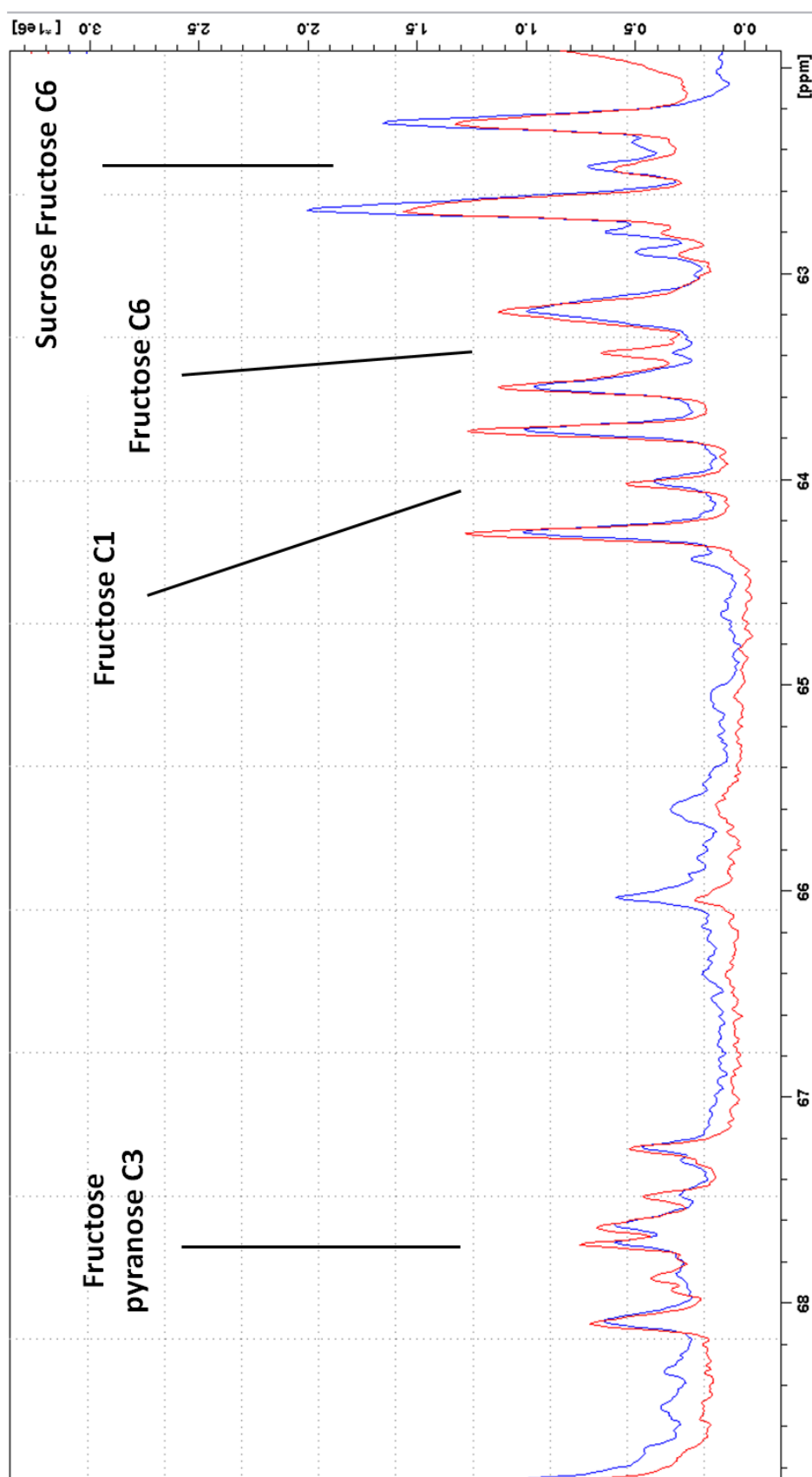
## b) Détail des positions identifiées dans le spectre total

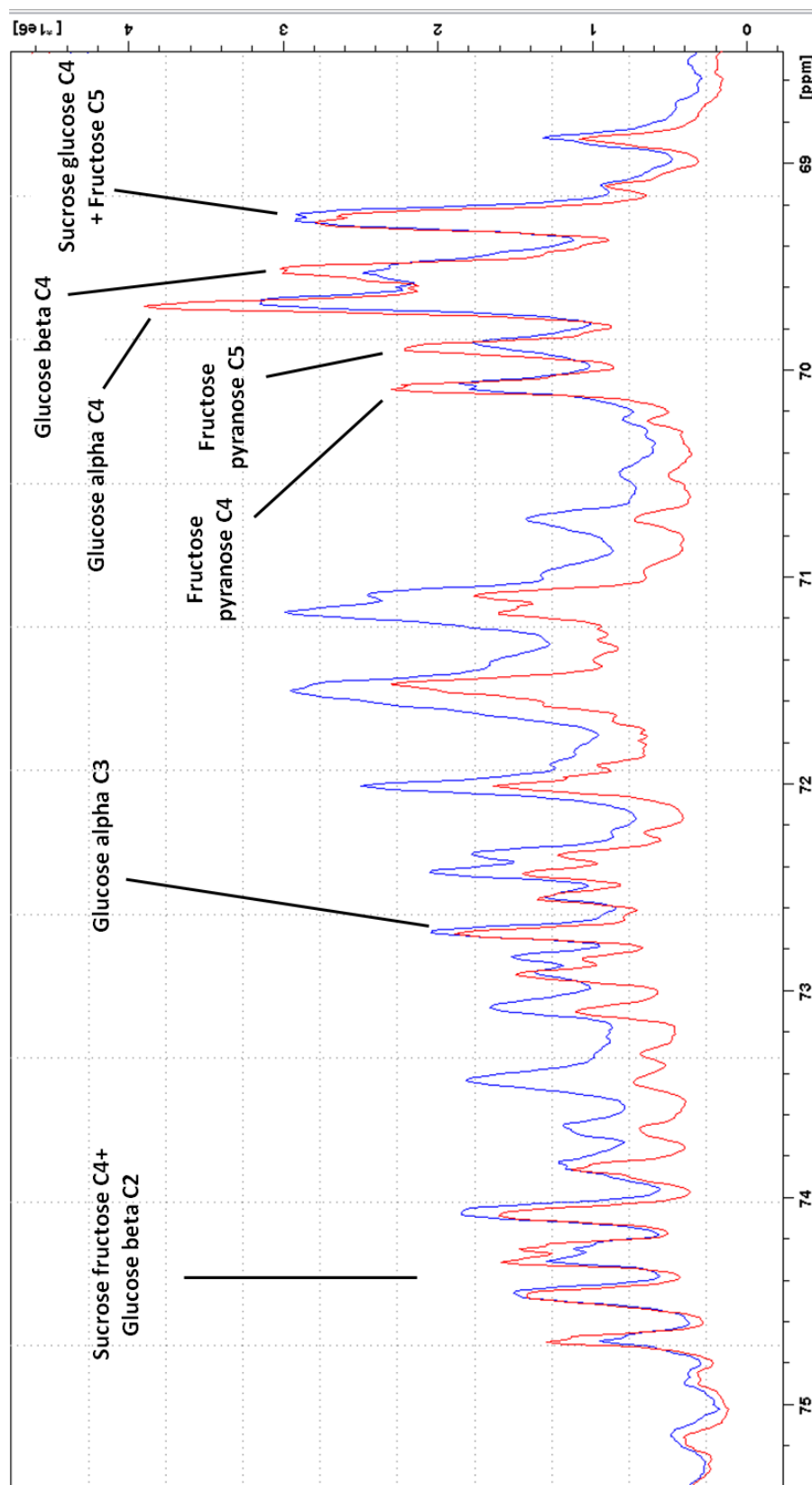


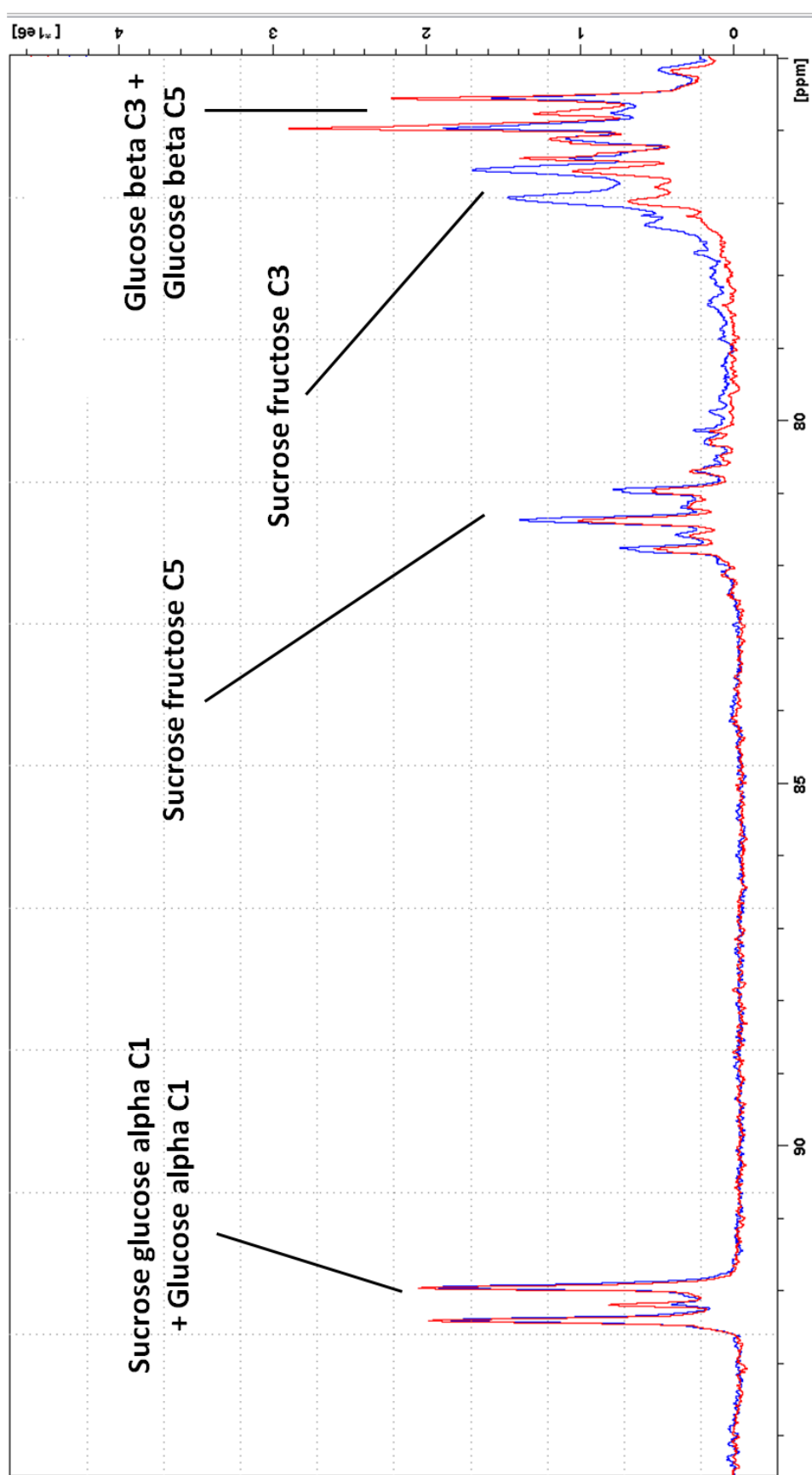




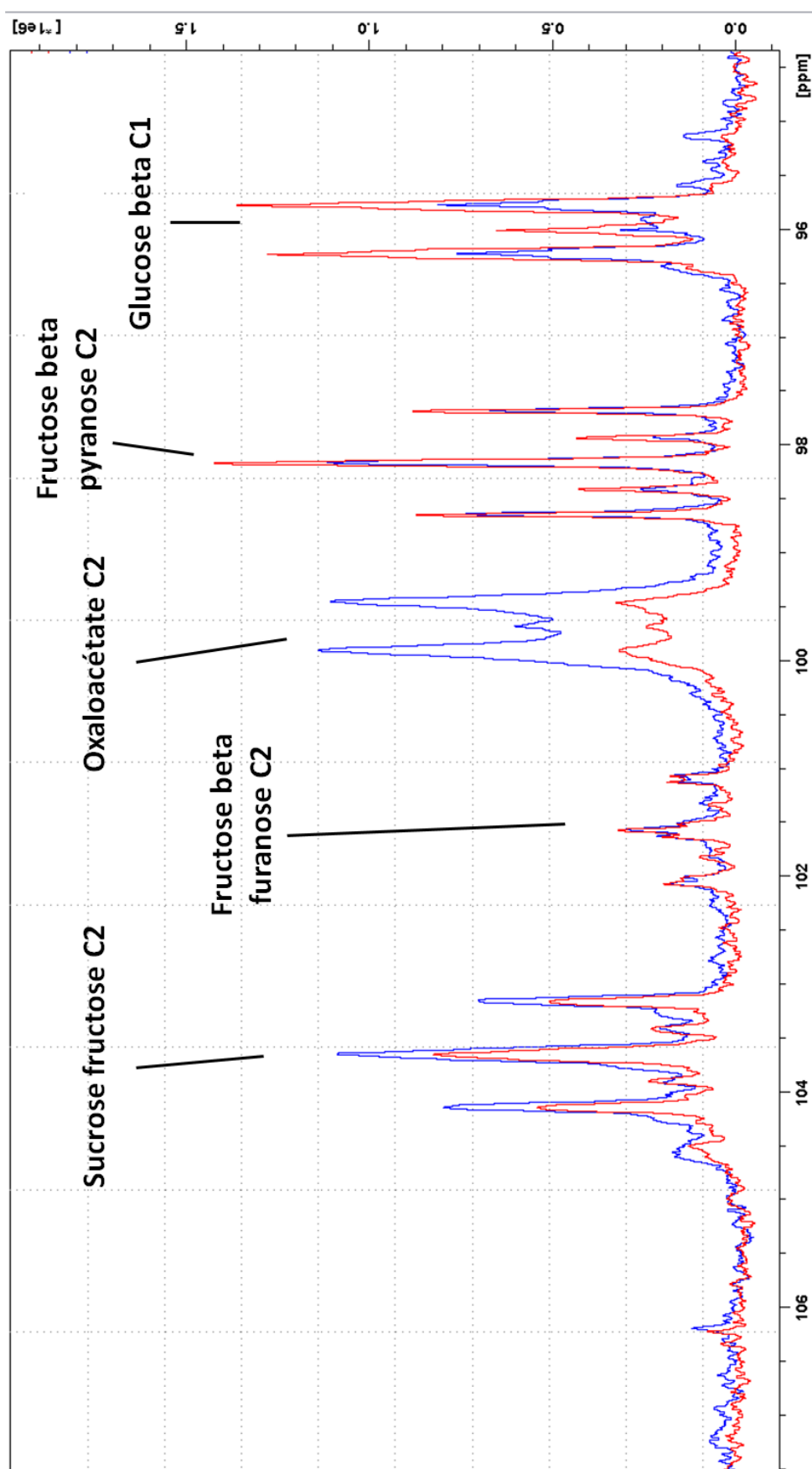


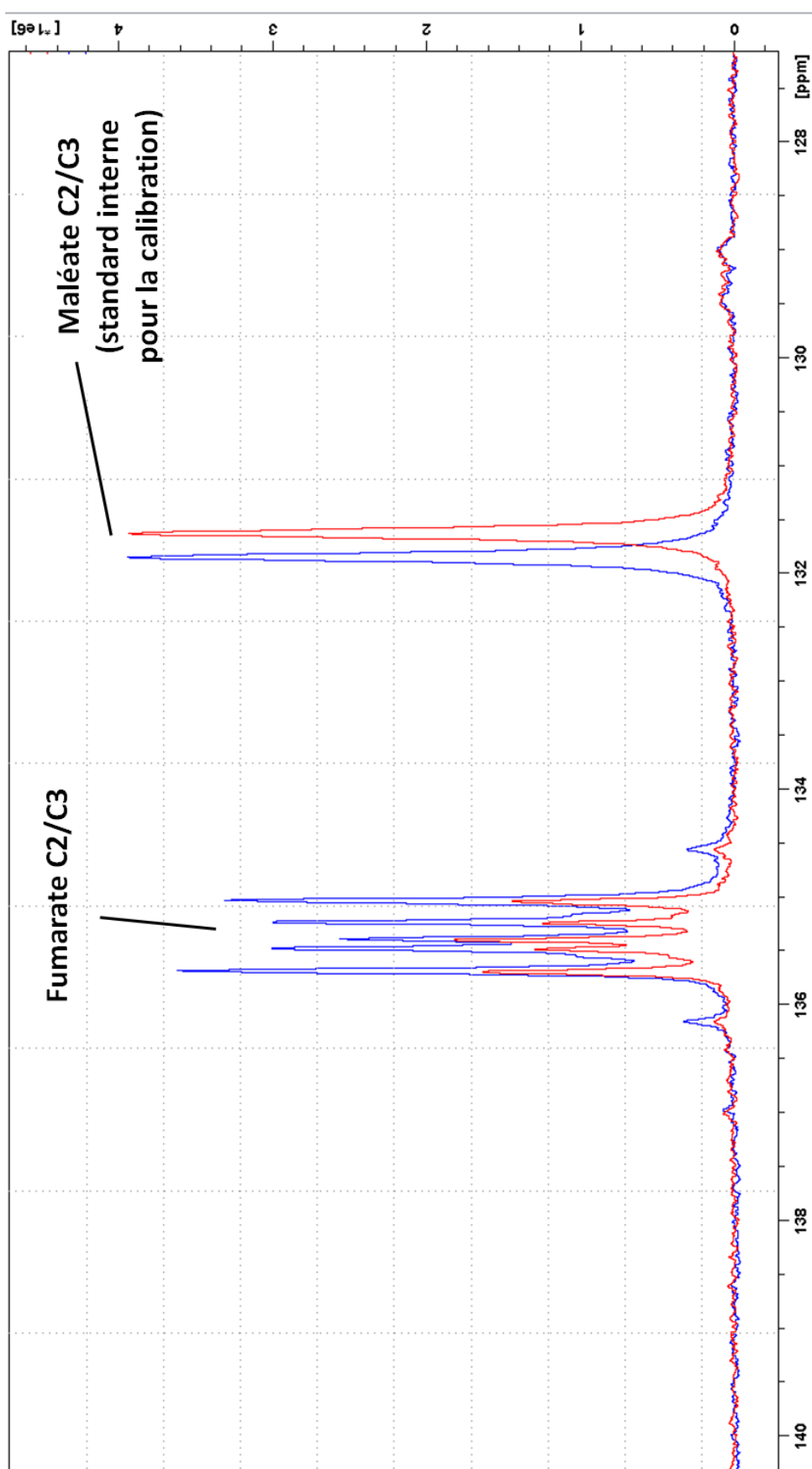


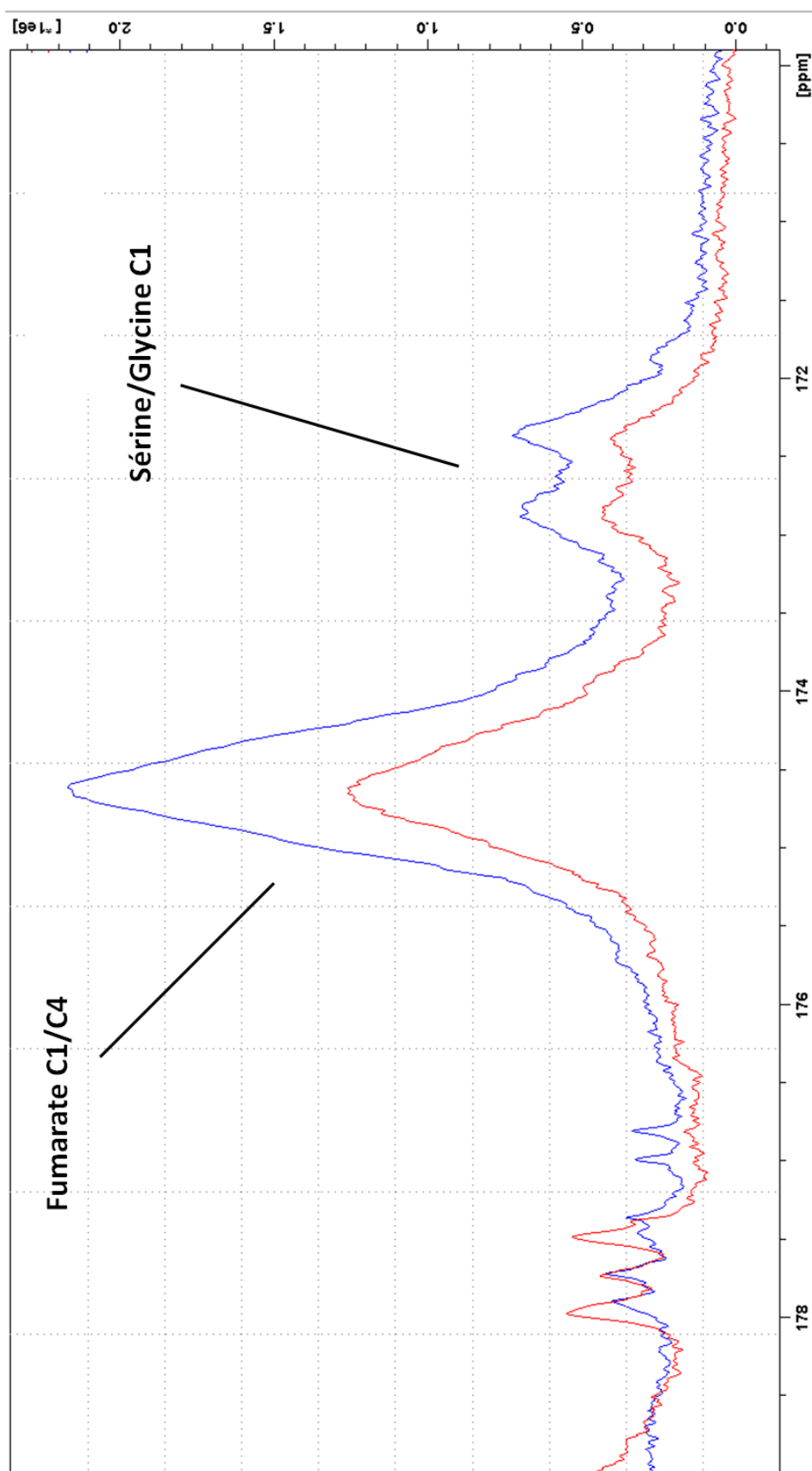


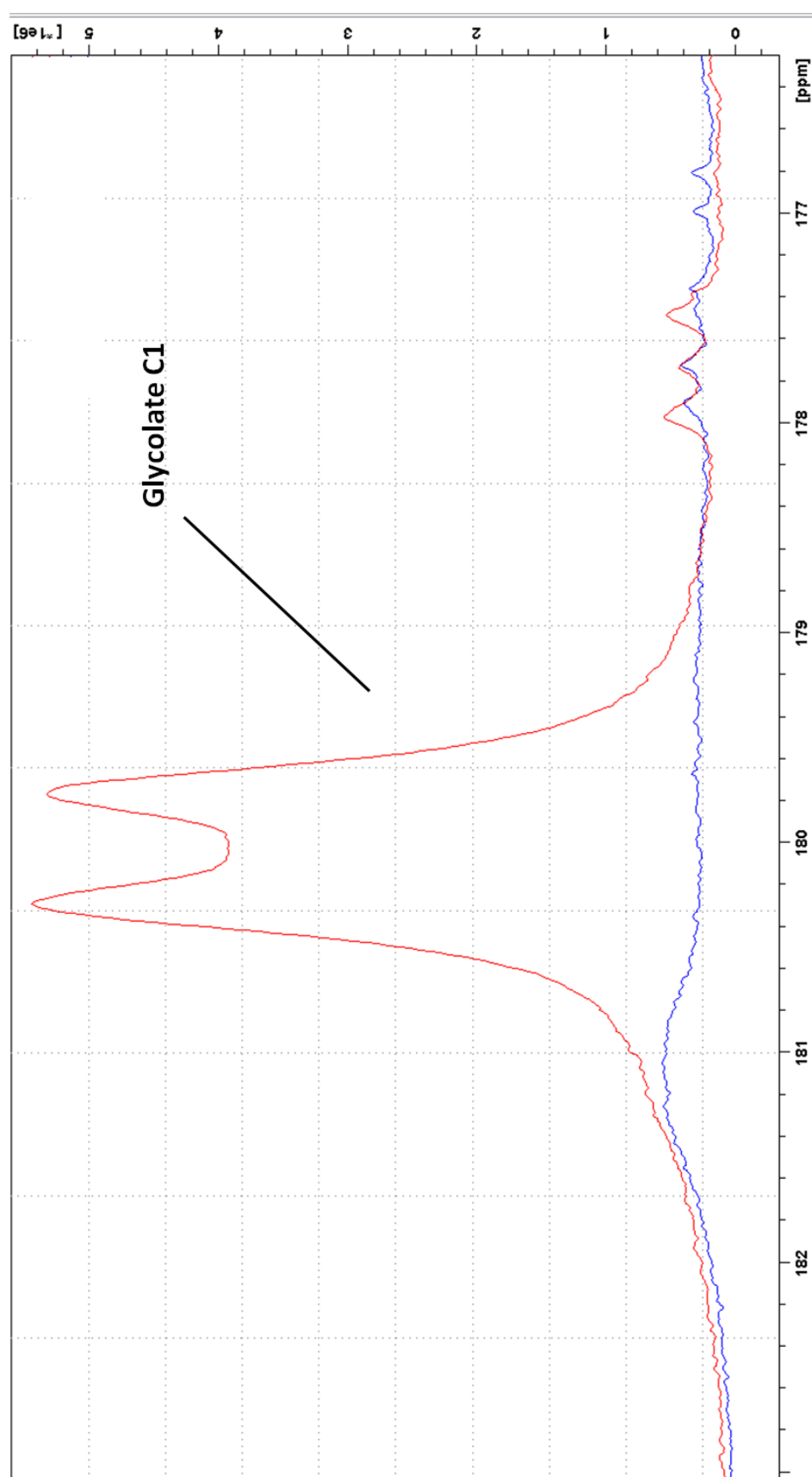






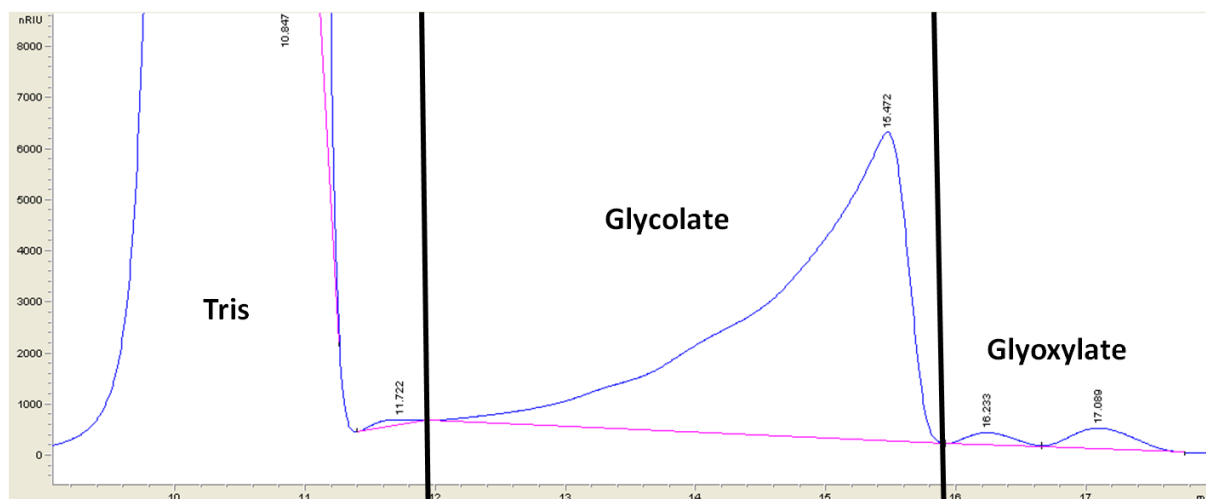




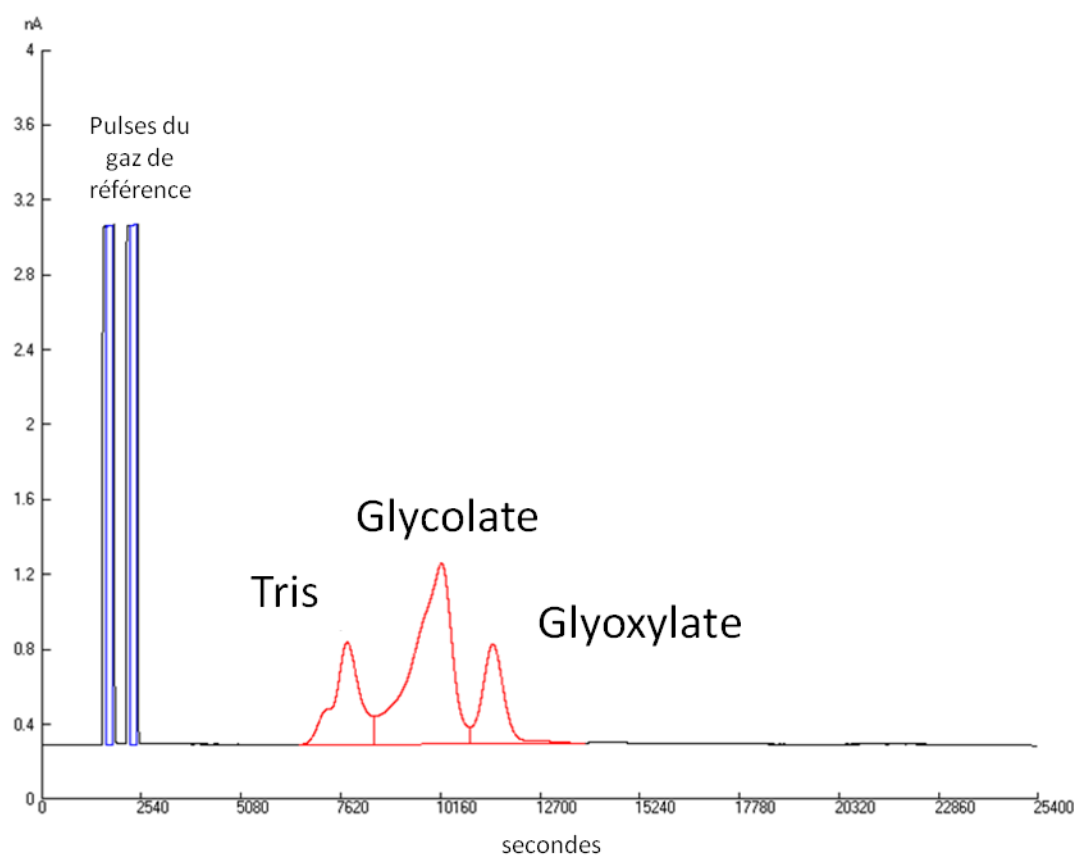


### III. Exemple de spectre de séparation du glycolate du mélange réactionnel de l'activité GOX par LC-c-IRMS

#### 1) Exemple de spectre obtenue durant la séparation par HPLC



#### 2) Exemple de spectre obtenue par IRMS après séparation par l'HPLC et couplage par la liquifac



## Résumé

A la lumière, l'activité carboxylase de la RuBisCO permet de fixer le CO<sub>2</sub> inorganique en matière organique, sous forme de 3-phosphoglycérate (3-PGA), qui sera utilisé pour la biosynthèse de sucres, d'acides organiques et aminés, de la paroi végétale etc. Cependant, elle possède aussi une activité oxygénase qui produit du 3-PGA et du 2-phosphoglycolate. Ce dernier composé étant toxique, il est métabolisé en 3-PGA par le cycle photorespiratoire qui se déroule dans le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie. Malgré une perte partielle en carbone et en azote, l'importance de la photorespiration pour les plantes est illustré par les phénotypes néfastes que les mutants d'enzymes photorespiratoires présentent dans l'air (comme un retard de croissance, la chlorose, et de la létalité) et qui sont absents en fort CO<sub>2</sub>. Ceci pourrait refléter des interactions étroites entre la photorespiration et le métabolisme primaire des plantes. Afin de mieux comprendre ces interactions et la mise en place des phénotypes photorespiratoires, des mutants pour la glycolate oxydase (GOX) et la glutamate:glyoxylate aminotransférase ont été caractérisés à travers plusieurs analyses complémentaires: des échanges gazeux, de la fluorescence chlorophyllienne, du marquage des métabolites avec du <sup>13</sup>C, des dosages de métabolites, de cofacteurs, et de la RuBisCO. Les résultats montrent que, suite à un transfert de fort CO<sub>2</sub> dans l'air, l'inhibition de la photosynthèse observée chez nos mutants est principalement due à un défaut du recyclage du carbone photorespiratoire qui diminue l'activité de la RuBisCO. Cette inhibition photosynthétique a un impact négatif sur la quantité de RuBisCO dans les feuilles de ces mutants par rapport aux plantes contrôles. De plus, lorsque l'inhibition de la photosynthèse est trop importante chez nos mutants photorespiratoires, la carence en carbone déclenche de la sénescence dans leurs feuilles âgées. En parallèle, une comparaison des paramètres cinétiques de la GOX d'*A. thaliana* (plante en C<sub>3</sub>) et de *Z. mays* (plante en C<sub>4</sub>) associée à la mesure d'effets isotopiques <sup>13</sup>C et <sup>2</sup>H a révélé que ces enzymes partageaient des paramètres Michaéliens équivalents pour le glycolate, ainsi qu'un mécanisme réactionnel identique mettant en jeu un transfert d'hydrure.

## Abstract

In the light, the RuBisCO carboxylase activity assimilates inorganic CO<sub>2</sub> into organic compounds, via the production of 3-phosphoglycerate (3-PGA) that is used for the biosynthesis of sugars, organic and amino acids, plant cell walls etc. However, it also has an oxygenase activity that makes 3-PGA and 2-phosphoglycolate (2-PG). The toxic 2-PG is metabolized to 3-PGA by the photorespiratory cycle, which takes place in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Despite a partial loss of carbon and nitrogen, the importance of photorespiration for growth can be seen by the negative phenotypes exhibited by photorespiratory enzyme mutants in air (*i.e.* slow growth, leaf chlorosis, and sometimes lethality), which are not observed under high CO<sub>2</sub> conditions. This may reflect the metabolic interactions between photorespiration and plant primary metabolism. To better understand such interactions and the development of photorespiratory phenotypes, mutants for glycolate oxidase (GOX) and glutamate:glyoxylate aminotransferase have been characterized by several complementary methods: analysis of gas exchanges, chlorophyll fluorescence, <sup>13</sup>C-labeling of metabolites, measurements of metabolites, cofactors and RuBisCO levels. The results show that, after a high CO<sub>2</sub>-to-air transfer, the inhibition of photosynthesis in the mutants is mainly due to a defect in photorespiratory carbon recycling leading to a decreased RuBisCO activity. The inhibition of carbon assimilation negatively impacts mutant leaf RuBisCO content when compared to wild-type plants. In the mutants, when photosynthetic inhibition is too high, the resulting carbon starvation triggers the onset of senescence in their old leaves. In parallel to this work, a comparison of the kinetic parameters of GOX from *A. thaliana* (C<sub>3</sub> plant) and *Z. mays* (C<sub>4</sub> plant) coupled to measurements of <sup>13</sup>C and <sup>2</sup>H kinetic isotopic effects showed that these enzymes share similar Michaelian parameters for glycolate, and a similar hydride transfer reaction mechanism.